

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Ingeniería Química



**CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA INDUSTRIA
PAPELERA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Claudia Esperanza Torres García

Bajo la dirección de la doctora

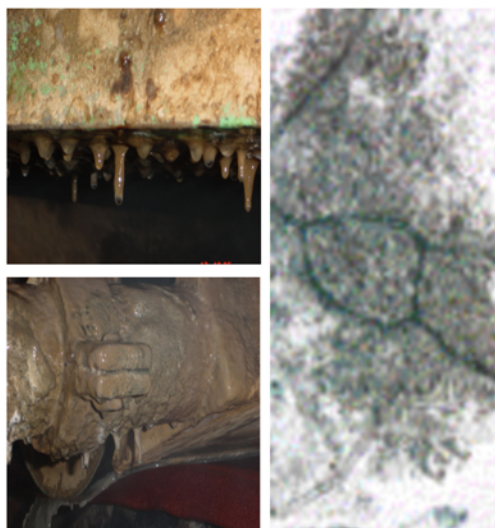
Ángeles Blanco Suárez

Madrid, 2012

Control Microbiológico en la Industria Papelera

Claudia Esperanza Torres García

**MEMORIA REALIZADA PARA LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE DOCTOR**



Dirección: Dra. Ángeles Blanco Suárez

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA
INDUSTRIA PAPELERA**

Memoria

**Que para optar al Grado de Doctor por la Universidad
Complutense de Madrid presenta**

Dña. Claudia Esperanza Torres García

2012

ÁNGELES BLANCO SUÁREZ, PROFESORA TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID

INFORMA

Que el trabajo de investigación titulado “Control microbiológico en la industria papelera”, se realizó bajo su dirección en el Departamento de Ingeniería Química, dentro de los proyectos del Grupo de Investigación de Celulosa y Papel de la Universidad Complutense de Madrid y constituye la memoria que presenta Dña. Claudia Esperanza Torres García, para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma la presente, en Madrid a 7 de mayo de 2012.

Resumen

La industria de celulosa y papel, sector comprometido con la sostenibilidad, ha realizado importantes cambios, con el fin de desarrollar procesos productivos, más eficientes y respetuosos con el medioambiente. Estos cambios están enfocados a la utilización de papel recuperado y a la optimización del consumo de agua durante el proceso productivo. Sin embargo, los mismos conllevan ciertas desventajas como es la formación de biopelículas, que requieren especial atención por los problemas que ocasionan tanto en el proceso como en la calidad del producto final. Por tanto, el objetivo de esta tesis doctoral se centra en la búsqueda de medidas que permitan prevenir o mitigar el efecto de los microorganismos.

En primer lugar, se realizó la identificación de los microorganismos considerados problemáticos mediante la hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Para ello, se desarrollaron y se validaron tres sondas FISH que posteriormente, se aplicaron sobre muestras de biopelículas, permitiendo caracterizar los efectos de tres tipos de productos antimicrobiológicos (**publicación I y II**).

En segundo lugar, teniendo en cuenta la importancia de algunos microorganismos en la formación de la biopelícula, se ha realizado un estudio detallado de los mismos considerando el estudio cinético de crecimiento de dos microorganismos catalogados como formadores primarios de biopelícula. El estudio cinético se basó en el seguimiento de los diferentes estados fisiológicos (vivos, muertos y dañados) que pueden presentar los microorganismos durante su crecimiento en condiciones normales. Para ello, se utilizó la citometría de flujo como técnica de vigilancia del crecimiento microbiano, posteriormente los datos obtenidos con esta técnica nos permitieron desarrollar dos modelos cinéticos segregados. La aplicación de estos modelos está encaminada al diseño de programas de control microbiano (**publicación V**).

En tercer lugar, se realizó la búsqueda de nuevos productos eficientes en el control de la formación de la biopelícula y a su vez respetuosos con el medio ambiente. Por lo que se estudiaron diecisiete productos enzimáticos comerciales, cinco biodispersantes y una nueva enzima desarrollada específicamente con este objetivo. Lo que permitió, la identificación de dos principios activos eficaces para evitar la formación de la biopelícula y promover su degradación (**publicación III y VI**).

Por último, se estudió la eficacia de la técnica de video microscopía continua como herramienta de seguimiento de la formación de la biopelícula. Para su validación, la técnica se aplicó al estudio de tratamientos antimicrobiológicos y sus resultados se compararon con las técnicas convencionales usadas a nivel de fábrica basadas en la

medición del peso de la biopelícula. Los resultados demuestran que la técnica puede ser una herramienta poderosa para (1) controlar la formación de biopelícula y su crecimiento, (2) determinar los efectos de los productos antimicrobianos sobre la formación de biopelícula, y (3) para seleccionar el tratamiento más eficiente y evaluar sus efectos sobre la contaminación biológica (**publicación IV**).

Agradecimientos

Este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de muchas personas que directa o indirectamente, participaron leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia y acompañándome en los momentos difíciles y de felicidad.

Quedo especialmente agradecida con mi directora de tesis la Prof. Ángeles Blanco Suárez y con el Prof. Carlos Negro por haber confiado en mí, por su paciencia y por la dirección de este trabajo. Gracias a ellos he podido participar en diferentes actividades relacionadas al mundo académico, que me han permitido culminar la tesis doctoral. Espero haber devuelto con este trabajo una parte de todos los esfuerzos que han realizado por mí durante estos años.

Mi más sincero agradecimiento al Prof. Julio Tijero, por todos sus comentarios científicos, por contestar muchas dudas y cuestiones y por ofrecerme su apoyo en todo momento. Las conversaciones que he mantenido con él han sido de gran ayuda en todo mi trabajo.

A las profesoras María Concepción Monte y Elena de la Fuente, les agradezco de todo corazón las lecturas y comentarios, tanto científicos como literarios de esta tesis, sus correcciones y su infinita paciencia. Además, su compañía incondicional y su amistad.

A las profesoras Margarita Martín y Alicia Gibello, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo y por compartir sus conocimientos de biología molecular gran parte fundamental de mi tesis doctoral.

A los profesores del Departamento de Ingeniería Química Victoria Santos, Almudena Alcón, Lourdes Calvo y Miguel Ladero, por su apoyo científico y moral durante todos estos años, han sido personas muy especiales con las que he podido hablar del trabajo que llevaba entre manos y que siempre han estado dispuestos a colaborar y a proporcionarme la ayuda necesaria. Mil gracias.

A mis amigos durante estos años, a Amalia mi experta en citometría preferida, a Antonio por sus charlas históricas y fantásticas, a K por nuestras locuras, siempre ocupará un lugar especial en mi corazón, a Javi mi amiguísimo del alma por nuestras charlas de apoyo psicológico mutuo, a Vane, Igor, Gonza y Sebas por los momentos bio y las risas compartidas. A mi queridísima Cuchipandi (Ro, Isa, Maiki, Palomi, Patri,

Helen y Luis) no me quiero imaginar ya esto sin ustedes, gracias por aprender a soportarnos, por ser sinónimo de compañía, amistad, paciencia y apoyo. Porque a pesar de todo (berrinches, pipetas, incubadoras, lasentec, grefusitos, etc.) continuamos en el mismo barco.

No me puedo olvidar tampoco de todos aquellos que, en un momento u otro han sido compañeros de camino durante estos años, Daphne, Rubén, Ruth, Noemí, Laura, Esther, Silvia, Belén y Juan Carlos muchas gracias por su apoyo.

A mis abuelos el eje principal de la familia, ninguno como ellos para entender lo difícil de vivir en la distancia, gracias por sus bendiciones y por su cariño sincero. Abuelo se que hoy no puedes compartir este logro, conmigo, pero estoy segura que estés donde estés estarás acompañándome.

A mi madre que de forma incondicional, entendió mis ausencias y mis malos momentos. Gracias mami por darme un ejemplo de fortaleza, por no permitir que abdicará en los momentos difíciles, y por el apoyo para que siguiera avanzando hacia mi objetivo.

A mi padre, que a pesar de la distancia siempre estuvo atento para saber cómo iba mi proceso, sus palabras de aliento, comprensión y apoyo, han sido un cimiento importante para mí.

A mi hermano quien a través de estos años ha sido una base muy importante de apoyo moral, por su ejemplo de lucha y tesón y sobre todo por su ayuda incondicional en los momentos que más lo he necesitado. A mí cuñada por los maravillosos momentos compartidos y por darme la gran alegría de ser tía de dos maravillosos tesoros. Verónica y Adriana, mis chicas, pequeños tesoros inspiradores de amor y ternura. Gracias por los bellos momentos que nos brindan.

A mi hija, mi faro de luz en la oscuridad, gracias mi vida por la compañía y los sacrificios durante este tiempo, el camino no ha sido fácil, pero lo hemos logrado, esta etapa que termina no es el final de nuestro camino. Cuento contigo para continuarlo...

Gracias a todos.

Lista de publicaciones originales

- I. **Torres CE**, Gibello A, Nande M, Martín M, Blanco A (2008). Fluorescent in situ hybridization and flow cytometry as tools to evaluate the treatments for the control of slime-forming enterobacteria in paper mills. *Appl Microbiol Biotechnol* 8:889-897.
- II. Blanco A, **Torres CE**, Negro C, Gibello A, Nande M, Martin M, (2010). Métodos y compuestos para la caracterización de la población bacteriana en biopelículas. Patente nº ES2330820B1.
- III. **Torres CE**, Lenon G, Craperi D, Wilting R, Blanco A (2011). Enzymatic treatment for preventing biofilm formation in the paper industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 92 (1): 95-103.
- IV. Blanco A, **Torres E**, Fuente E, Negro C (2011). New tool to monitor biofilm growth in industrial process waters. *Ind Eng Chem Res.* 50: 5766-5773.
- V. **Torres E**, Ladero M, López P, Alcon A, Santos V, Blanco A (2011). Flow cytometry and kinetic models applied to viability study of isolated strains from paper industry. *Biochem Eng J.* En revisión.
- VI. **Torres CE**, Negro C, Blanco A, Fuente H (2012). Minireview: enzymatic approaches in paper industry for pulp refining and biofilm control. *Appl Microbiol Biotechnol.* En revisión.

Abreviaturas

AIC	Criterio de información Akaike.
ADNr	Ácido desoxirribonucleico recombinante.
API	Sistema de identificación de microorganismos.
ARB	Base de datos genómicos Universidad de Munich.
BD	Becton Dickinson.
BFB	Bacterias productoras de biopelícula.
BLAST (Basic	Programa de comparación de secuencias genéticas Local Alignment Search Tool).
BRS	Bacterias reductoras de sulfato.
CECT	Colección española de cultivos tipo.
CEPI	Confederación de industrias papeleras de Europa.
CF	Citometría de flujo.
CIM	Corrosión inducida por microorganismos.
CY3	Derivado del isotiocianato.
DSZ	Colección de microorganismos y cultivos celulares alemana.
EMBL	Laboratorio de Biología Molecular Europeo
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares.
FISH	Hibridación in situ con marcadores fluorescentes.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
IP	Ioduro de propidio.
NT	Naranja de tiazol.
PVM	Video-microscopía continúa.
REACH	Reglamento Europeo comunitario sobre productos químicos.

SQR	Suma de las desviaciones (residuales) al cuadrado.
UFC	Unidades formadoras de colonias.

Índice

1	Introducción.....	1
1.1	Fabricación del papel y fuentes de contaminación microbiológica	2
1.2	Microorganismos en la industria papelera	3
1.3	Consecuencias de la actividad de los microorganismos.....	5
1.4	Control microbiológico en la industria.....	8
1.4.1	Programas de control con biocidas.....	9
1.4.2	Programas de control con dispersantes.....	13
1.4.3	Degradación enzimática de los depósitos microbiológicos.....	14
1.4.4	Otros métodos de prevención y control de la formación de la biopelícula	15
1.5	Métodos empleados para la monitorización de biopelículas	16
2	Necesidades de investigación y objetivos de la tesis doctoral	23
3	Materiales y métodos	25
3.1	Microorganismos.....	25
3.2	Medios de cultivo	26
3.3	Sistemas de flujo continuo.....	27
3.4	Tratamientos de control.....	27
3.4.1	Ensayos preliminares	29
3.4.2	Ensayos con productos enzimáticos comerciales.....	29
3.4.3	Ensayos con la nueva enzima desarrollada.....	31
3.4.4	Ensayos con biodispersantes	31
3.5	Medidas de densidad óptica.....	33
3.6	Citometría de flujo	33
3.7	Hibridización in situ con marcadores fluorescentes (FISH).....	34
3.8	Microscopía confocal.....	35
3.9	Video-Microscopía Continua	36
3.10	Modelos cinéticos.....	37
4	Resultados	39

4.1	Identificación de microorganismos formadores de biopelícula ..	39
4.1.1	Diseño de las sondas de oligonucleótidos.....	39
4.1.2	Condiciones óptimas de hibridización	40
4.1.3	Análisis del tratamiento enzimático	42
4.2	Tratamientos de control aplicados sobre bacterias formadoras de biopelículas.....	44
4.2.1	Ensayos preliminares.....	44
4.2.2	Tratamientos con productos enzimáticos comerciales	46
4.2.3	Tratamiento con la nueva enzima desarrollada	53
4.2.4	Tratamientos con biodispersantes.....	55
4.3	Video Microscopía Continua: nueva técnica de seguimiento de la formación de la biopelícula.....	62
4.3.1	Ensayos con cultivos puros.....	62
4.3.2	Ensayos con comunidades mixtas	64
4.4	Estudio de la viabilidad celular sobre bacterias formadoras de biopelícula por citometría de flujo. Modelos cinéticos.....	70
4.4.1	Densidad óptica frente a Citometría de flujo.....	70
4.4.2	Caracterización de estados fisiológicos por citometría de flujo.....	72
4.4.3	Modelo cinético	74
5	Conclusiones	79
6	Recomendaciones futuras.....	83
7	Bibliografía.....	85

1 Introducción

El papel está presente en todos los ámbitos de la vida con una gran variedad de productos que cubren necesidades muy variadas en el campo de la cultura, el arte, la educación, el comercio y el transporte de todo tipo de mercancías, etc.

Los mayores productores de pasta de celulosa y productos papeleros son Estados Unidos (34%) y Canadá (14%), seguidos por China (10%), Finlandia (6%), Japón (6%), Suecia (6%) y la antigua Unión Soviética (2%).

España es el séptimo país europeo en producción de celulosa y el sexto en producción de papel y cartón (CEPI 2010). España tiene un total de 124 plantas industriales, entre las que se encuentran algunas de las más modernas de Europa. La producción total española en el año 2010 fue de 8,4 millones de toneladas de las que 6,4 fueron de papel y 2 de pasta de celulosa.

En la última década, el sector papeler español ha logrado reducir considerablemente el consumo de agua y energía, así como las emisiones y residuos generados, gracias al desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías. Con una producción similar de pasta y papel, el consumo de agua en 2010 se ha reducido un 11,2% con respecto al consumo del año 2006. Los vertidos se han reducido en el periodo 2007-2010, hasta situarse en 31,9 m³/t para la pasta (frente a 35 m³/t en 2006) y en 7,8 m³/t para el papel (frente a 8,7 m³/tonelada en 2006) mejorando la calidad de los efluentes, con la consiguiente disminución del impacto medioambiental (ASPAPEL 2011).

El cierre de los circuitos de agua ocasiona diferentes problemas dentro de la producción, que se enumeran a continuación:

- Aumento de la temperatura (Berard 2000).
- Aumento de la concentración de materia disuelta y coloidal contaminante en el agua de proceso (Belosinschi y Bobu 2007).
- Formación de depósitos de origen biológico, también llamados biopelículas (Rattö y col. 2005, Desjardins y Beaulieu 2003, Lindberg y col. 2001, Sigrun y col. 1999, Blanco y Gaspar 1996, Robertson y Schwingel 1995, Safade 1988, Dieter 1981).
- Producción de malos olores en el producto, así como en los alrededores de la fábrica, debidos al metabolismo de la población microbiana presente en las aguas de proceso (Berard 2000).

Esta tesis doctoral se centra en el estudio de los problemas microbiológicos y su control.

1.1 Fabricación del papel y fuentes de contaminación microbiológica

La fabricación del papel se realiza a partir de fibras celulósicas obtenidas de madera (40,4%), pasta no procedente de la madera (1,1%), papel recuperado (43,9%) y materiales no fibrosos (14,6%) (CEPI 2010).

La fibra reciclada es una materia prima importante para la industria del papel. A nivel europeo la cantidad de papel recuperado utilizado para la producción de pasta en 2010 fue de 57,1 millones de toneladas (CEPI, 2010). El uso de papel recuperado como materia prima tiene como consecuencia, una contaminación microbiológica mil veces superior a las pastas de fibra virgen (Sorrelle y Belgard 1991, 1992, Allison 1984). Esto se debe principalmente a la suciedad y a la humedad del medio en el que se recoge, transporta y almacena antes de su reutilización en la fábrica (Fig. 1).



Figura 1.- Almacenamiento papel recuperado.

En la fabricación de la pasta, la primera etapa del proceso es la desintegración de las materias primas, que consiste en la separación de las fibras para obtener una masa fibrosa apta para la posterior producción de papel. Esta etapa se lleva a cabo mediante procedimientos mecánicos, térmicos y químicos, siendo de vital importancia el uso del agua.

El agua de alimentación, puede contribuir al crecimiento microbiano supliendo nutrientes e introduciendo nuevos microorganismos al sistema. La calidad del agua varía en función de la fuente donde se toma (agua superficial o aguas subterráneas), la estación y la localización geográfica. Por ejemplo, el uso de agua superficial aumenta la presencia de algas en el sistema, especialmente cuando se utilizan sin tratamiento previo o cuando se reutilizan las aguas de proceso. En este caso se

observa un aumento en la concentración de microorganismos filamentosos presentes en el sistema, como las bacterias del hierro y del azufre y los actinomicetes.

Tras la desintegración, la pasta se depura para eliminar contaminantes de gran tamaño (plástico, metales o cintas adhesivas), se destinta y se blanquea. Posteriormente, la pasta se introduce en la caja de entrada de la máquina de papel, que distribuye de manera homogénea la suspensión de pasta sobre la mesa de formación, obteniéndose así una banda continua de papel. La máquina de papel se divide en dos secciones principales:

- Sección húmeda: la suspensión de pasta se dosifica sobre la tela de formación para obtener un gramaje determinado. El agua que contiene la pasta se elimina por gravedad (en la mesa de formación), luego por succión (producida por las cajas de vacío) y, por último, por prensado, alcanzando la banda de papel un 40% de sequedad al final de esta sección.
- Sección seca: el papel se seca posteriormente con unos rodillos giratorios que se calientan por medio de vapor de agua y por los cuales avanza la banda de papel.

En función del producto final, será necesario llevar a cabo una serie de tratamientos superficiales para mejorar sus propiedades como: la resistencia, el brillo, la opacidad, etc. Los tratamientos superficiales más utilizados son el calandrado, el estucado y el encolado.

Las disoluciones o suspensiones de aditivos, cargas, pigmentos, almidones, baños de estucado, etc., pueden ser otra fuente importante de microorganismos, especialmente cuando se almacenan largos periodos de tiempo y en malas condiciones, permitiendo su crecimiento. Los almidones y productos de estucado son a menudo fuente de nutrientes (Robertson y Taylor 1994). Por otra parte, las cargas minerales y los adhesivos, que se encuentran en las pastas recicladas, facilitan la formación de depósitos, al ser éstos puntos de anclaje para las colonias de bacterias y hongos. Por el contrario, cabe señalar que la presencia de colofonias (resinas naturales) y compuestos de aluminio retrasan, en general, la proliferación de los microorganismos (Hughes 1993).

1.2 Microorganismos en la industria papelera

Las aguas de proceso de la industria papelera tienen una gran variedad de microorganismos debido a que sus características son extremadamente favorables para el crecimiento de los mismos (Tabla 1). No sólo son adecuadas las condiciones de pH, sino que además estas aguas contienen sustancias disueltas biodegradables necesarias para su desarrollo, como fuentes de carbono (celulosa, almidones, etc.),

nitrógeno (caseína), sales minerales (PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) y oligoelementos (Fe, Zn, Cu, etc.) (Ekman y col. 2007, 2011, Alén 2007, Blanco y col. 1996, Latorre 1990).

Tabla 1.- Composición típica de la microflora de las máquinas de papel y cartón.

Autor (año)	Microorganismos aislados
Oppong y col. (2000)	Bacterias productoras de depósitos rosas: <i>Micrococcus agilis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Serratia sp</i> , <i>Alcaligenes viscosus</i> .
Suihko y col. (2004, 2005) Suihko y Skyttä (2009)	Mesofílicos: <i>Brevibacillus</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Paenibacillus</i> . Termofílicos: <i>Bacillus</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , proteobacteria y actinobacteria. Los más frecuentes: <i>B. Simplex</i> <i>B. Licheniformis</i> , <i>B. Amyloliquefaciens</i> <i>B. Cereus</i> (5%), <i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> <i>Paenibacillus stellifer</i> , <i>P. Turicensis</i> o <i>Leptothrix sp.</i> <i>Brevibacillus centrosporus</i> y <i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> .
Oppong y col. (2003)	<i>Flectobacillus sp.</i> <i>Chryseobacterium</i> , <i>Norcardiopsis alba</i> y <i>Streptomyces</i> , <i>Albido alvus</i> aislados de pasta.
Desjardins (2003)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , y <i>Pseudoxanthomonas</i> .
Lal y col. (2008)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> y <i>Klebsiella</i> .
Kjeldsen y col. (2009)	Aislamiento de bacterias sulfato reductoras de una planta que usa papel reciclado.
Prince y col. (2009)	<i>Chloroflexi</i> , <i>Clostridiales</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Burkholderiales</i> y el género <i>Deinococcus</i> . <i>Deinococcus sp.</i> , <i>Meiothermus sp.</i>
Disnard y col. (2011)	<i>Chloroflexi</i> , <i>Clostridiales</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Burkholderiales</i> y el género <i>Deinococcus</i> . <i>Deinococcus sp.</i> , <i>Meiothermus sp.</i>

Si la concentración de oxígeno es suficiente, se desarrollarán preferentemente bacterias aerobias, entre las que se encuentran las principales responsables de la producción de depósitos microbiológicos. Por el contrario, si la concentración de oxígeno disminuye, habrá predominio de especies anaerobias, que son las responsables de los problemas de olor y corrosión (Bennet 1985, Väättänen y Niemelä 1983, Jung y Kutzner 1978). Por otra parte, el aumento de la temperatura hace que las poblaciones varíen de especies mesófilas a especies termófilas, las cuales tienen una menor tendencia a la formación de depósitos microbiológicos, pero son más difíciles de eliminar debido a su capacidad para formar esporas. La descripción anterior pone de manifiesto la importancia, no sólo de la identificación del problema microbiológico, sino también de su origen, con el fin de poder seleccionar el tratamiento más adecuado para su prevención, tratamiento y control en cada caso particular.

1.3 Consecuencias de la actividad de los microorganismos

El desarrollo incontrolado de microorganismos en las fábricas de papel y cartón produce graves pérdidas económicas debido a diferentes causas como muestra la figura 2.



Figura 2.- Frecuencia de los diferentes problemas en la industria de papel asociados a microorganismos (fuente: Pauly y Ronninger 2000).

Formación de depósitos microbiológicos, agujeros y manchas

Una biopelícula se define como una comunidad de microorganismos que crecen adheridos a una superficie, inmersos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). La matriz de EPS confiere a estas bacterias una mayor resistencia frente a agentes externos. Las biopelículas pueden estar presentes en distintos puntos del proceso (Fig. 3): (1) interfase sólido-líquido, en el fondo de tanques de almacenamiento y en tuberías, (2) fase líquida, formando aglomeraciones en el agua, (3) interfase líquido-aire, en la superficie de tanques de almacenamiento de aguas donde los niveles cambian continuamente y (4) interfase aire-sólido, sobre las partes del proceso donde no fluye agua (Kallio y col 2004, Bryers 2000).

Las biopelículas presentan características físicas variables y se acumulan a distinta velocidad en función de las características del sistema, condiciones de limpieza de la máquina, carga microbiana inicial, etc. (Costerton 2007, Blanco 2003, Stoodley y col. 2002, Watnick y Kolter 2000, O'toole 2000, Costerton y Lappin 1995, Väisänen y col. 1998, Characklis 1990, Safade 1988).

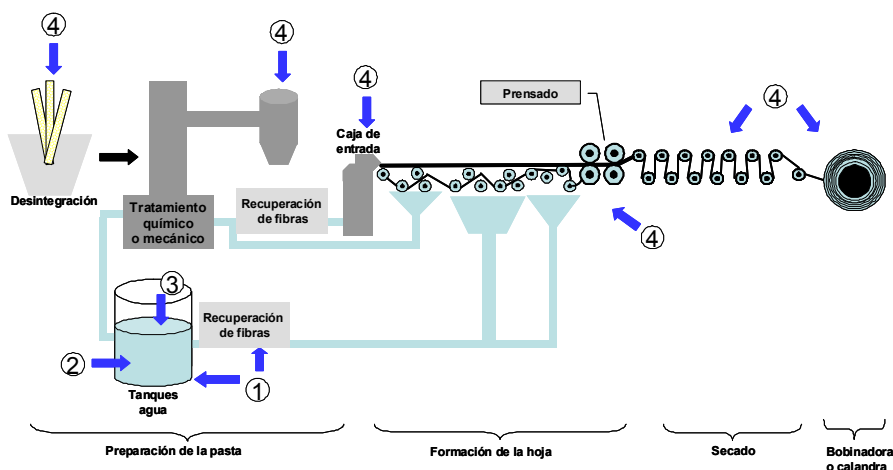


Figura 3.-Esquema de la producción de papel y puntos críticos de formación de biopelícula.

En la industria papelera la biopelícula, además de los microorganismos y de la matriz de EPS, presenta fibras, finos y cargas minerales (Fig. 4). Si además existen depósitos de partículas sólidas en alguna parte del sistema de tuberías, los microorganismos pueden acumularse alrededor de ellas (Eklund y Lindström 1991). Un exceso de biopelículas en los circuitos de agua produce defectos en el papel o roturas durante la fase de formación de la hoja (Alén 2007, Rätto y col. 2005, Kolari y col. 2002, Kolari 2003), por lo que pueden conducir a importantes pérdidas económicas.

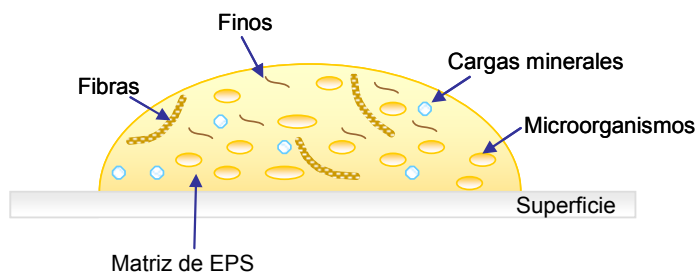


Figura 4.- Esquema de una biopelícula.

Corrosión inducida por microorganismos

La corrosión inducida por microorganismos (CIM) se produce directa o indirectamente como resultado de su actividad metabólica (Ford y Mitchell 1990, Cloete y col. 1992, Von Holy 1985). Los microorganismos son de varios tipos, como por ejemplo las bacterias oxidantes de sulfuro (principalmente del género *Thiobacillus*), que forman ácido sulfúrico; las bacterias del hierro de los géneros *Gallionella*, *Pseudomicrobium* y *Siderococcus*, que oxidan el ión ferroso a férrico, catalizando la deposición de tubérculos; y las bacterias filamentosas del género

Leptothrix, que depositan óxidos de hierro en sus cápsulas. Algunas especies de *Metallogenium*, *Pseudomicrobium* y *Leptothrix*, oxidan el manganeso (Mn^{2+}), originando la deposición de sales de Mn^{4+} fuera de su pared celular y ocasionando el aumento del desarrollo de la biopelícula y las reacciones microbianas que llevan a una disminución del potencial redox y del oxígeno. Esto provoca la degradación del metal e inicia el proceso de corrosión (Kielemoes y col. 2002, Lewandowski y col. 2002).

Las bacterias reductoras de sulfato (BRS) se consideran las principales responsables de la CIM. En su presencia, el acero y otras aleaciones sumergidas en aguas anoxigénicas se corroen cuatro veces más rápido que sumergidas en aguas oxigénicas (Blanco y col. 2004).

Producción de gases explosivos y de malos olores

La producción de gases explosivos y de malos olores por ciertas bacterias es de gran importancia en fábricas que utilizan fibras recicladas como materia prima. Este problema se debe a la presencia de bacterias anaerobias y aerobias. Entre las anaerobias destacan el género *Clostridium* y de las bacterias productoras de metano, causantes de graves accidentes en varias fábricas de cartón (Rowbottom 1989 y 1993, Rochibaud 1991, Sorrelle y Belgard 1991, Cox 1989).

Los problemas de malos olores se deben a la generación de ácidos grasos volátiles y de ácido sulfhídrico. Los ácidos grasos más comunes son el acético (C2), propiónico (C3) y butírico (C4). Numerosos organismos anaerobios producen estos ácidos, como producto final de la metabolización de compuestos orgánicos como proteínas, almidón y otros.

En el caso de las bacterias aerobias, encontramos géneros como *Streptomyces albus*, productor de metilsoborneol y geosmin (Merdsker y col. 1969, Gerber 1983, Blevins y col. 1995, Sugiura y col. 1997, Sugiura y col. 1998); *Bacillus licheniformes*, productor de 3-metil-3-sulfanil hexano-1-ol (Trocaaz 2004) y *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella oxytoca* que son bacterias heterotróficas que, al descomponer la materia orgánica, producen compuestos sulfurosos.

Contaminación de aditivos

La contaminación de aditivos como el talco, el caolín y el carbonato de calcio se deben en parte, a que provienen de minas naturales y, por lo tanto, vienen cargados de microorganismos, o a que se almacenan durante mucho tiempo en malas condiciones, que favorecen el crecimiento de microorganismos. Este tipo de productos son, por lo general, tratados con biocidas (Kanto y col. 2001). El almidón usado

para aumentar la resistencia del papel también es foco de contaminación. La adición de este compuesto a la suspensión de la pasta requiere de una cocción previa del producto que puede alcanzar temperaturas por encima de 130°C. El tiempo que permanece la solución de almidón a esta temperatura es inferior a 10 s, y permite que las esporas resistentes al calor de la mezcla contaminada vuelvan a crecer en la máquina (Alén 2007, Pirttijärvi y col. 2001).

Calidad higiénica de los productos papeleros

La calidad higiénica de los productos papeleros, se ve afectada por la capacidad de algunos de los microorganismos de crear esporas resistentes al calor de la zona de secado de la máquina de papel. Entre los más destacados se encuentran el género *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* (Alén 2007). La producción de productos higiénicos de papel, como el papel tisú o los diferentes envases para alimentos, requieren que estos índices de esporas sean bajos, ya que pueden poner en peligro la inocuidad de los alimentos (Pirttijärvi y col. 1996).

1.4 Control microbiológico en la industria

Los métodos comúnmente empleados para el control y prevención microbiológica se pueden dividir en diferentes categorías: programas preventivos (recubrimientos y protección catódica), programas de limpieza y programas de control.

Los programas preventivos controlan las características físicas que debe tener la máquina para evitar la formación de los depósitos microbiológicos, o al control de la calidad tanto de las materias primas usadas en el proceso como de las diferentes zonas susceptibles de contaminación. Algunos ejemplos son, el tratamiento del acero de la máquina sometido a tratamientos mecánicos y/o electrolíticos o el uso de revestimientos no tóxicos como la silicona, resinas epóxicas o compuestos fluorados; que eviten o dificulten la formación de la biopelícula (Videla 2002).

Cuando la instalación está en funcionamiento, los programas preventivos deben incluir el tratamiento de las corrientes de entrada al sistema (la alimentación del agua fresca o la incorporación de los aditivos), el control del tiempo de residencia y de la agitación en los tanques de almacenamiento (para evitar zonas muertas que puedan llevar a la aparición de ambientes anaerobios), el control químico del potencial incrustante del agua y por último, la optimización del proceso de retención, para reducir la presencia de nutrientes como de depósitos de finos, cargas, residuos resinosos y otros aditivos.

Antes de aplicar un programa de control, hay que limpiar las superficies de depósitos biológicos, orgánicos e inorgánicos para evitar

problemas en el proceso. Los programas de limpieza pueden ser de tipo físico o químico (Videla 2002, Flemming 2002).

- **Limpieza física:** elimina los depósitos por medios físicos. Puede consistir en una operación de cepillado, en hacer incidir agua, arena o gravilla contra la superficie a limpiar, o en la incorporación de esferas de goma limpiadoras.
- **Limpieza química:** consiste en la eliminación de depósitos mediante la adición de sustancias que reaccionan con el mismo. Se suele aplicar precedida de una limpieza física. Es efectiva en zonas de difícil acceso y áreas de ataque localizado. En el caso de las incrustaciones (carbonato cálcico, sulfatos o silicatos), se requiere un tratamiento, por lo general, a partir de ácidos inorgánicos, como el ácido clorhídrico o el ácido sulfhídrico, polímeros de fosfatos orgánicos o fosfatos. Por otro lado, los depósitos microbiológicos también se pueden limpiar mediante proceso físico o mediante el uso de dispersantes para mantener los microorganismos en suspensión.

1.4.1 Programas de control con biocidas

En Europa se gastan anualmente más de 200 millones de euros en el control de microorganismos en la industria papelera (Finnish Environmental Institute 2007). De acuerdo a la Directiva Europea relativa a la comercialización de biocidas (98/8/CE), los **biocidas** se definen como sustancias activas y preparados que contienen una o más sustancias activas, presentados en la forma que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos.

En la actualidad en la industria papelera se emplean dos clases de biocidas: oxidantes y no oxidantes.

Los biocidas oxidantes se dividen en sustancias activas halogenadas y no halogenadas. Oxidan irreversiblemente las proteínas, provocando: pérdida de la actividad enzimática, hidrólisis de los constituyentes orgánicos y, consecuentemente, la muerte rápida de las células (Kolari y col. 2003, Kanto 2008). En la actualidad los compuestos oxidantes son los más habituales porque son más baratos, se degradan rápidamente y los productos de degradación son menos tóxicos, si bien, pueden afectar negativamente a la estabilidad de la máquina (Kiuru 2012).

Los biocidas oxidantes **halogenados** son:

- Cloro gas: Su efectividad como biocida depende de la proporción de ácido hipocloroso presente. Es muy poco

efectivo a pH 8 y a pH bajo se potencia el poder corrosivo. Destruye esporas pero algunas bacterias como el *Desulfovibrio desulfuricans* desarrollan resistencia. Se aplica al agua de alimentación.

- Sales de hipoclorito: Son sales del ácido hipocloroso. Principalmente se utilizan la sal sódica y la cálcica. Para el tratamiento de aguas, el más usado es el hipoclorito sódico. Se aplica al agua de alimentación.
- Derivados halogenados de la hidantoína alquilo; 1-Bromo-3-cloro-5,5-dimetil hidantoína (BCDMH), 5,5-dimetil hidantoína (DMH): Son efectivos contra bacterias filamentosas. Los compuestos bromados se liberan inmediatamente como ácido hipobromoso.
- Dióxido de cloro: es más letal que el cloro gas para células vegetativas y esporas. Su efectividad no se ve afectada por cambios de pH, aunque su toxicidad aumenta a pH altos. Se aplica al agua de alimentación. Su mayor limitación es que su manipulación es peligrosa.
- Bromuro de sodio: Mezclado con hipoclorito de sodio y adicionado al agua que circula en el proceso incrementa su eficacia contra la formación de biopelícula y hace que el hipoclorito de sodio sea menos susceptible a hidrolizarse a pH bajo.
- Bromuro de amonio y sulfato de amonio: Crean monohaloaminas que reaccionan de forma similar a los compuestos de cloro, pero de una manera más suave porque no tienen poder destructivo. Se usan para controlar las aguas de proceso.

Los principales biocidas no halogenados son:

- Peróxido de hidrógeno: Genera radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) que reaccionan rápidamente y son responsables de la acción antimicrobiana. Es efectivo a pH entre 2 y 10. Activo contra las esporas. Se aplica en aguas de proceso.
- Ácido peracético: más efectivo que el peróxido de hidrogeno. Tiene un amplio espectro de actividad que incluye a las esporas. Genera radicales orgánicos (CH_3CO) que reaccionan igual que los radicales hidroxilo pero son más estables en el tiempo. Se puede aplicar a las aguas del proceso y al agua de alimentación.

Debido a que los agentes oxidantes operan por contacto, su aplicación preferencial es en sistemas limpios, bajo condiciones de tratamiento que aseguren una mínima limpieza para que la acción del

biocida pueda mantenerse activa. La acción de los oxidantes sobre la biopelícula es únicamente en la superficie, manteniendo el interior de ésta metabólicamente activa.

Los biocidas no oxidantes son usados como tratamiento principal o como complemento a la acción de biocidas oxidantes. Debido a las limitaciones de los productos oxidantes, el uso de este tipo de sustancias se ha extendido porque evitan los problemas medioambientales del cloro y los problemas de corrosión asociados a algunos biocidas oxidantes.

La acción de los agentes no oxidantes consiste generalmente, en un envenenamiento lento de las células, alterando su metabolismo de alguna forma.

Los principales agentes no oxidantes utilizados en la industria papelera son:

- Sales de amonio cuaternario: Conocidos como “quats” (abreviatura del inglés “Quaternary”, son compuestos de nitrógeno catiónicos y con actividad sobre la tensión superficial del agua. No actúan sobre las esporas y son efectivos entre pH 6 y 8. Se pueden aplicar en el agua de alimentación o en el agua de proceso.
- Aldehídos: Estos compuestos han demostrado efectividad frente a bacterias tanto aerobias como anaerobias. Su efectividad es más limitada frente a algas y hongos. Se usan tres tipos de compuestos: (i) el glutaraldehído, que presenta una buena actividad frente a esporas y es más efectivo a pH por encima de 8; (ii) el tetra hidroximetil fosfonio sulfato, cuya acción bactericida se basa en la liberación de formaldehído, y (iii) el bronopol, con eficacia a pH entre 5 y 9. Su acción combinada por dos grupos toxofóricos (halógeno activado y metilol) hace que reaccionen con los centros nucleofílicos de las células (ADN y proteínas) produciendo la inactivación de los microorganismos. Se aplican en circuitos de agua o como agentes preservantes, en especial el glutaraldehído.
- Isotiazolonas: Pueden controlar bacterias aerobias y anaerobias (incluidas las sulfatoredutoras) así como hongos y algas. Su actividad se ve afectada por la presencia de dureza, amonio, cloruros o sólidos en suspensión. Reaccionan con grupos nucleofílicos de las células. Se usan como agentes conservantes.
- Compuestos de nitrilos: Este grupo de compuestos incluye la dibromo-nitrilopropionamida (DBNPA) y el metilen-bistiocianato (MBT). Son microbicidas de amplio espectro con particular eficacia sobre las bacterias. Se usan en circuitos de agua o como tratamiento conservante.

Generalmente en la industria papelera los biocidas son utilizados como conservantes o como antiincrustantes.

Los biocidas de **tipo conservante** son:

- Protectores de la madera empleados para la protección, desde la fase del aserradero, o de los productos derivados de la madera, mediante el control de los organismos que destruyen o alteran la madera. Se incluyen tanto los de carácter preventivo como curativo.
- Protectores de fibras utilizados para la conservación de materiales fibrosos, como los productos de papel, mediante el control del deterioro microbiano.
- Protectores para líquidos, utilizados en procesos industriales para la conservación del agua u otros líquidos usados en la elaboración industrial, mediante el control de los organismos nocivos como microbios, algas y moluscos.
- Productos antimoho usados para la prevención o el control de la proliferación de moho sobre los materiales, equipos y estructuras usadas en procesos industriales, por ejemplo sobre la madera y la pasta de papel.

Los biocidas **tipo antiincrustante** se emplean para el control de la fijación y crecimiento de organismos incrustantes (microbios o formas superiores de origen animal o vegetal) en estructuras acuáticas.

Cuando se aplican biocidas en el proceso de fabricación de papel se debe tener en cuenta que: (1) muchos biocidas son absorbidos en la pasta y se inactivan; (2) los aditivos pueden neutralizar el efecto del biocida; y (3) se ha de limitar el tiempo de contacto para evitar los mecanismos de resistencia. Por otra parte, se deben realizar ensayos previos en lo posible en circuitos totalmente cerrados, y, si esto no es posible, en el laboratorio, con el fin de determinar la dosis óptima de los ingredientes activos más apropiados para el sistema y, por último, el biocida debe ser de amplio espectro (Simoes y col 2010, Schrijver y Wirth 2007, Videla 2002, Mattila y Wirtanen 1992).

El modo de acción de los biocidas industriales es un tema de creciente interés. La función de los agentes antimicrobiales se puede dividir en seis efectos letales que controlan el crecimiento de los microorganismos: (1) coagulación de proteínas, (2) inactivación de enzimas, (3) daño a nivel de lípidos celulares, (4) daño en el sistema genético, (5) destrucción de ácidos ribonucleicos y (6) daño a nivel de membranas celulares (Kanto 2008).

El factor más importante que afecta a la eficacia del biocida es la resistencia que presentan las bacterias, formando biopelículas o por intercambio de información genética de unas bacterias a otras. Este

hecho se presenta cuando el componente activo del biocida o el régimen de tratamiento no han sido los apropiados (Palcic y Teodorescu 2002), creando serios problemas microbiológicos en la planta de producción.

La regulación de los biocidas a nivel mundial es un tema de gran importancia en la actualidad, debido a su efecto sobre la salud humana y a las descargas de los mismos al medio ambiente. De este modo, no sólo la eficacia y la compatibilidad de un biocida con el proceso es importante, sino que también su toxicidad y su ecotoxicidad deben ser considerados (REACH 2006).

1.4.2 Programas de control con dispersantes

El uso de dispersantes ha aumentado considerablemente durante los últimos años debido a la tendencia a reducir la toxicidad de los sistemas de control de depósitos ocasionada por los biocidas. La característica principal de los dispersantes es su capacidad para reducir el tamaño de las partículas en suspensión, disminuyendo la posibilidad de sedimentación y, por tanto, la formación de depósitos microbiológicos (Safade 1988). Por otra parte, los dispersantes actúan como "biopenetradores" abriendo poros en las biopelículas y permitiendo a los biocidas penetrar a través de los EPS hacia el interior de las células (Barnes 1984) por lo que, en este caso, el dispersante debe ir acompañado de otros productos para actuar de manera eficaz en la reducción de los depósitos (MacDonald y col. 2000, Robertson 1994). Las principales sustancias usadas en la industria papelera se resumen en la tabla 2. A concentraciones industriales estos dispersantes alteran las propiedades de las superficies sumergidas por disminución de la tensión superficial, otro mecanismo de control de la adhesión de los organismos.

Este tipo de tratamientos pueden aplicarse en combinación con una dosis baja de biocidas y pueden ser aplicados en las aguas de proceso (Van Haute 1999, Schenker y col. 1996). Deben ser utilizados con precaución, ya que un uso excesivo puede causar problemas en las propiedades finales del papel o en las distintas etapas del proceso (Johnsrud 1997, Kanto y col. 2001).

Por ejemplo, la pasta de fibra reciclada se somete a un proceso de destintado, en el que se aplican los dispersantes para separar las partículas de tinta de la fibras y evitar que se redepositen. La posterior eliminación de las tintas se puede hacer por procesos de flotación. La eficiencia de este tipo de procesos puede verse afectada por una alta concentración de dispersantes, ya que, disminuye el tamaño de los aglomerados de tinta evitando que estos sean separados (Beneventi y Carre 2001).

**Tabla 2.-Biodispersantes empleados en la industria papelera
(Schiver y Wirth 2007).**

Compuesto	Base química	Zona de aplicación
Glicol	Alcoholes	Aguas de proceso y cabeza de máquina
Amidas	Alquilamidas	
Terpenos	Terpenoides	
Lignosulfatos	Sales de ácido lignosulfónico	
No iónico y aniónico	Alcohol	
Catiónico, híbrido iónico	Ácidos grasos	

1.4.3 Degradación enzimática de los depósitos microbiológicos

Las enzimas pueden afectar a la colonización y adherencia de los microorganismos en cuatro formas diferentes. En primer lugar, atacan las estructuras necesarias para la formación de la biopelícula (membrana celular o apéndices) de los microorganismos, impidiendo su sedimentación (Longhi y col. 2008, Oulahal y col. 2007). En segundo lugar, las enzimas pueden degradar los polímeros de la matriz que se han formado una vez los microorganismos han sedimentado. En tercer lugar, las enzimas pueden catalizar la liberación de compuestos anti-incrustantes de la superficie. Estos compuestos pueden ser tóxicos o no tóxicos, pero suelen ser mucho menos estables que los biocidas convencionales, lo que evita el problema de bioacumulación de sustancias nocivas. Por último, interfieren en la comunicación intercelular durante la colonización de una superficie, etapa necesaria para la formación de la biopelícula (Kristensen y col. 2008).

Existen varias enzimas comerciales, pero la llamada EDC-1, desarrollada por Moor y Hach (1984), fue una de las primeras que salieron al mercado (Delord 1999, Grant 1998). La EDC-1 es una enzima que hidroliza y despolimeriza la fructosa del polisacárido levano, que es uno de los componentes de la matriz extracelular de la biopelícula. La enzima actúa como catalizador de la ruptura del levano en formas solubles de menor peso molecular, y continúa hidrolizando los polímeros solubles hasta formar fructosa. Esta enzima sólo reacciona con el levano y no hidroliza la glucosa del almidón ni de la celulosa. Como la fructosa no tiene las propiedades pegajosas que posee la molécula de levano, la EDC-1 elimina los depósitos existentes en la máquina y previene la formación de los mismos (Safade 1988, Colasurdo y Wilson 1988). El efecto de la enzima puede incrementarse por la adición del 10% de la dosis normal de biocida al sistema de aguas de recirculación debido a la

mayor susceptibilidad de las bacterias al biocida (Freis 1984). Sin embargo, en las investigaciones realizadas por Verhoef y col. (2002) y Rattö y col. (2001) en colaboración con el Grupo de Investigación de Celulosa y Papel de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), se demostró que el levano es un polisacárido producido en presencia de sacarosa. La sacarosa se encuentra en muy pocas cantidades en la madera y las bacterias que producen el levano son consideradas secundarias en la actualidad. Esto justifica la baja eficacia de esta enzima a nivel industrial.

En el estudio realizado por Verhoef en el año 2005, también en colaboración con el Grupo de Investigación de Celulosa y Papel de la UCM, sobre la caracterización y degradación enzimática de los EPS de biopelícula, se observó que de 18 cepas aisladas de muestras de biopelículas de máquinas de papel de distintos países, las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* presentaban en común la producción de ácido colánico. En base a estos resultados se está desarrollando la enzima Colanasa que degrada este tipo de EPS, los estudios realizados con esta enzima han demostrado ser efectivos sobre la degradación de biopelículas de distintas características (datos no publicados por acuerdos de confidencialidad).

Otros trabajos realizados en este campo fueron la producción de una familia de productos llamados Darazyme, por el grupo Gracia Dearborn, el desarrollo de estos productos se basa en la identificación preliminar de los componentes de la biopelícula y la posterior aplicación de una enzima o una combinación de enzimas seleccionadas específicamente para degradar los EPS identificados (Bajpai 1999).

Por otro lado, la casa comercial Buckman Laboratories, diseñó una serie de productos llamados Neotéricos® que son una mezcla de enzimas y dispersantes, que se adicionan en la zona húmeda de la máquina de papel y reemplazan a los tratamientos tradicionales con biocidas orgánicos u oxidantes, reduciendo la toxicidad y la exposición peligrosa del medio ambiente.

1.4.4 Otros métodos de prevención y control de la formación de la biopelícula

Eliminación de depósitos microbiológicos por limitación de un nutriente. Este proceso se desarrolló como alternativa a la aplicación de biocidas (Oberkofler 1990). Se basa en el equilibrio biológico existente entre los niveles de la población bacteriana y el umbral de nutrientes. Si este equilibrio se rompe, por ejemplo por una variación rápida del pH, de la temperatura o por la adición de sustancias tóxicas, las bacterias pueden responder a la agresión de diferentes maneras, como por ejemplo, mediante la producción de EPS para protegerse del medio agresivo (Morros 1995). El control de la biodisponibilidad de nutrientes

se consigue mediante la inmovilización de moléculas que tienen diferentes funciones en la célula (Morros 1995, Porton y Dubout 1995, Oberkofler 1990).

Bacteriófagos es otro método de control de la biopelícula que está en estudio. Los bacteriófagos son parásitos intracelulares que se multiplican en el interior de la bacteria. Los EPS de la biopelícula pueden normalmente proteger a las células bacterianas contra la mayoría de bacteriófagos. Sin embargo, si un bacteriófago posee una despolimerasa polisacárido específica, puede ser capaz de degradar los EPS y acceder a las superficies bacterianas. Consecuentemente, éste puede causar la muerte a través de la infección celular o lisis, así como la degradación de los EPS (Sutherland y col. 2004, Hughes 1998).

Inhibición del sistema de señales. El descubrimiento de una diversidad de sustancias en plantas, bacterias y algas que estimulan específicamente o inhiben la regulación del sistema de señales en varias bacterias, puede representar una nueva clase de compuesto antibacteriano con uso potencial en el control de la biopelícula. La identificación química de estos compuestos imitadores es necesaria, además, del conocimiento del papel que desempeñan en la inhibición y el mecanismo por el cual engañan a la bacteria impidiendo su comunicación con otras (Bauer y Robinson 2002). Otro factor importante, son las técnicas de seguimiento del intercambio de señales químicas entre las bacterias para ejercer un control más directo sobre la formación de la biopelícula. McLean y col. (2004), estudiaron dos microorganismos sensores, el *Agrobacterium tumefaciens* y el *Chromobacterium violaceum* capaces de detectar el intervalo de producción de las acil-homoserina-lactonas (HSLs).

1.5 Métodos empleados para la monitorización de biopelículas

Existe un amplio número de técnicas que se han utilizado en el estudio de adhesión, colonización, agregación y formación de biopelículas, tanto a nivel industrial como a nivel de laboratorio. La expansión en el uso de técnicas nuevas ha surgido por la necesidad de controlar la formación de la biopelícula y evaluar la efectividad de las posibles medidas que se tomen para evitar su formación (Klahre y Flemming 2000, Videla 2002).

Las técnicas empleadas para evaluar la eficacia de los sistemas de control de la contaminación biológica se pueden clasificar en dos categorías: (1) técnicas que suponen la destrucción parcial o total de la muestra analizada, y (2) técnicas no destructivas para el seguimiento en línea.

Entre las **técnicas destructivas** las más utilizadas son: el peso seco, el conteo en placa, las técnicas basadas en microscopía (microscopía de

epifluorescencia, microscopía confocal, microscopía de transmisión y microscopía electrónica de barrido), recuento de bacterias sésiles, cuantificación de ácidos nucleicos, y la medición de actividad microbiana (Costerton y Lappin 1995, Jass y col. 1995, Morris 1997, Christensen y col. 1999, Wirtanen y col. 2001, Hadjiev y col. 2007, Ludensky 2003, 2007, Chavant y col. 2007, Torres y col. 2008). Las técnicas destructivas mencionadas pueden proporcionar información detallada sobre la biopelícula, pero requieren mucho tiempo y no son adecuadas para experimentos de detección a escala industrial.

En los sistemas industriales, los métodos de control más utilizados se basan en el análisis de los depósitos formados sobre cupones y en la vigilancia de los puntos críticos de formación de la biopelícula sometidos a una limpieza previa (Costerton 2007), aunque la formación de biopelícula ocurre también en áreas con acceso complicado (por ejemplo, en tuberías).

Las **técnicas no destructivas** están típicamente enfocadas en la medición de los depósitos de suciedad, sin evaluar su carácter biológico, o en la medición directa de la acumulación.

Las técnicas más habituales de este grupo consisten en: (i) métodos ópticos como la turbidez diferencial (Klahre y Flemming 2000) y sensores de fibra óptica (Tamachkiarw y Flemming 2003, Chandy y col. 2000), (ii) métodos basados en la medición de los cambios en resistencia al transporte, como son los basados en la medida de la caída de presión y/o de transferencia de calor o el aumento de la resistencia eléctrica debidos a la acumulación de biopelícula (Janknecht y Melo 2003) y (iii) técnicas electroquímicas como la impedancia y la capacitancia (Ramaraja y col. 2008, Mauricio y col. 2006). Como ya se ha indicado, estos métodos no son capaces de detectar las primeras etapas en la fijación de los microorganismos, ya que requieren que el espesor de la biopelícula supere el umbral de detección mínimo (Janknecht y Melo 2003). Además, la mayoría de sensores de fibra óptica se basan en la medición de la intensidad de luz recibida por un detector y no toman imágenes reales.

Otro tipo de clasificación de las medidas es la dada por Janknecht y Melo (2003): medidas de la formación de depósitos, medidas de productos metabólicos, análisis de imagen computarizada, detección de señales de radiación, detección de señales eléctricas y detección de señales de vibración.

Cuantificación de depósitos

En el estudio de la formación de depósitos, los diferentes autores asumen que cualquier depósito formado sobre una superficie es una biopelícula de composición más o menos conocida y que es suficiente

determinar su grosor. Entre estas técnicas se encuentra **la medida de turbidez diferencial** (Klahre y Fleming 2000), que se basa en la medición de turbidez en un flujo de aguas de proceso en la industria papelera. Para ello se usan dos turbidímetros, uno de ellos se limpia con regularidad mientras que el otro no, por lo que la diferencia entre los dos instrumentos correspondería a la acumulación del depósito. Una de las desventajas de este método, es que no es capaz de detectar biopelículas más delgadas de 0,1 mm. Esto puede ser un factor limitante para el seguimiento de tratamientos de control que tengan como objetivo las primeras etapas de formación de la biopelícula, ya que esta formación, depende de la capa condicionante y de su grosor, que puede alcanzar de 30 a 80 nm en 15 min (Korber y col. 1995) y de ella depende o no la formación del depósito.

Otra técnica usada para el control de depósitos es la **sonda de fibra óptica** (Tamachkariow y Flemming 2003), basada en la aplicación de luz desde debajo de la superficie. Esta luz se dispersa por la deposición de objetos en el extremo de la fibra óptica, las señales son recogidas y enviadas a una unidad de detección y cuantificación. Esta técnica no permite medir el grosor de la biopelícula ni proporciona imágenes de lo que sucede en las tuberías.

Otro aspecto que se ha tenido en cuenta es que, cuando la biopelícula se adhiere a una superficie, causa dos efectos directos en el flujo: (i) aumenta la rugosidad de la superficie y (ii) reduce el área transversal de paso del flujo, provocando que haya una resistencia a la transferencia de calor (Wan y Xiao 2011) y una caída de presión (Vrouwenvelde y col. 2010), por lo que estas dos medidas han sido aprovechadas para realizar el seguimiento de formación de depósitos. En el caso de **la técnica de medida de transferencia de calor**, las principales limitaciones se encuentran en qué: (i) el patrón hidrodinámico de los sensores no representa lo que está ocurriendo en los intercambiadores de calor, (ii) la medida en las paredes de las tuberías están sometidas a incertidumbres experimentales que son difíciles de evitar, y (iii) la técnica no tiene la suficiente sensibilidad para detectar la formación inicial del depósito. **La medida de la caída de presión** tiene como desventaja que los cambios en el factor de fricción se detectan sólo cuando la biopelícula tiene un grosor entre 30-35 μm adherido a la superficie.

Por último, cabe destacar las **medidas del grosor** basadas en la cuantificación del espesor de la biopelícula por medio de una aguja unida a un micrómetro. Esta medición se basa en la diferencia encontrada cuando la aguja toca la interfase líquido-biopelícula y el sustrato al cual esta adherida. La mayor desventaja de esta técnica es que hace medidas puntuales y que no valora todo el sistema.

Medidas de productos metabólicos

Los microorganismos que forman parte de la biopelícula, necesitan requerimientos especiales para su crecimiento, una parte de estas medidas realiza el seguimiento de su metabolismo o rasgos bioquímicos característicos. Las medidas realizadas pueden ser de tipo gaseoso (Bastos y col. 2002), como son la **cantidad de oxígeno o dióxido de carbono** que se hayan consumido o la **producción de metano** (Pereira 2003), o de tipo metabólico como las **medidas de adenosin trifosfato (ATP)** (Monds y col. 2010). Estas medidas están influenciadas por las características del medio y por la rapidez en que sean procesadas las muestras, sobre todo en el caso del ATP, ya que los medios empleados para su medición incluyen enzimas que son muy lábiles, pues no resisten la exposición a la luz.

Análisis de imagen computarizado

Existen muchas técnicas que permiten obtener imágenes de la formación de una biopelícula, la mayoría basadas en técnicas microscópicas, que requieren la preparación de la muestra, así como un equipamiento para la toma de las imágenes, por lo que hace difícil su aplicación a nivel industrial. Aunque se han investigado en los 90, no han sido aplicadas aún en el estudio de la biopelícula de forma continua y en tiempo real (Nivens y col. 1995).

Detección de señales de radiación

Entre las señales de este tipo, destaca la **bioluminiscencia** generada por la biomasa sin el requerimiento de ninguna energía externa. Algunos microorganismos, son capaces de emitir una señal de luz por una reacción enzimática incorporada en su metabolismo que es aprovechada por los investigadores para detectar su presencia. Su limitación se basa en que esta señal depende de diversos factores ambientales y esta medida se puede llevar a cabo cuando los requerimientos de crecimiento son óptimos (Angell y col. 1993). Además, la bioluminiscencia se limita solo a algunos organismos, lo que hace que esta técnica esté muy dirigida a la investigación en laboratorio.

Otra técnica en la que se emplean las radiaciones emitidas es la **fluorometría**. En este caso se mide la cantidad de luz emitida por una sustancia que se ha empleado específicamente para marcar algún o algunos componentes de la biopelícula como la biomasa, EPS o moléculas específicas, como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Esta técnica está limitada a estudios en laboratorio con condiciones ambientales definidas.

Por otra parte, **la espectroscopía** se basa en la medida de la radiación absorbida por los diferentes grupos moleculares o funcionales presentes en la muestra. Existen diferentes variantes que se han empleado para el estudio de la biopelícula, como **la reflexión total atenuada (ATR)**, en la cual se usan diferentes tipos de superficie sobre las cuales se hace incidir un rayo de luz infrarroja. Esta tiene tres variantes: la ATR con ondas evanescentes, en la cual se hace uso de un cristal empleado como transmisor y que se caracteriza por tener un índice de refracción alto; la ATR con resonancia de plasma superficial, que usa un metal como capa de menor índice de refracción, y la microscopía de reflexión total interna, en la que las ondas evanescentes sirven para iluminar la biopelícula y así observarla al microscopio. Estas técnicas están limitadas a la zona más cercana en la que inciden los rayos infrarrojos. Su límite de detección fue estimado en 5×10^5 células y solo han sido empleadas a nivel de laboratorio (Janknecht y Melo 2003).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se puede emplear con fines cuantitativos. Algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en la región de las frecuencias de radio o radiofrecuencias. Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno de estos núcleos, se puede emplear para determinar la estructura de la molécula en donde se encuentran éstos. Se ha empleado para el estudio de los fenómenos de transporte y de la estructura de las biopelículas (Manz y col. 2003). Una de las limitaciones de la técnica es la necesidad, en algunos casos, de la purificación de los analitos que se estudian, haciendo que esta técnica sea de difícil aplicación a nivel industrial.

La espectroscopia fotoacústica se basa en el calor producido por un cuerpo debido a la absorción de radiación óptica de un flujo energético incidente. El haz de luz incide con frecuencia variada. La conversión de luz en calor es medida a través de sensores. Esta técnica permite conocer el grosor y la homogeneidad de la biopelícula, así como caracterizar los diferentes componentes cuando se comparan las respuestas a pulsos de las longitudes de onda que se usan para irradiar la muestra (Schmid y col. 2003).

Señales eléctricas

Existen diversas formas de obtener señales eléctricas de los microorganismos para saber si están dentro de un sistema. **Las técnicas electroquímicas** son herramientas básicas para el seguimiento de este tipo de señales. A través de diferentes electrodos, que se introducen en la fase acuosa, es posible detectar los cambios en el potencial eléctrico o su respuesta pasiva a la aplicación de voltajes. El

uso de estos electrodos se empleó en el estudio de la corrosión causada por las biopelículas. Las medidas como el potencial de corrosión, proporcionan la diferencia de potencial entre el metal y el electrodo de referencia (Mollica y Cristiani 2003). **El ruido electroquímico** también puede ser medido para detectar las fluctuaciones en el potencial. Un aspecto crítico de esta técnica es la evaluación estadística y la interpretación de las señales que se obtienen. Otra desventaja es que estas técnicas indican la actividad microbiológica pero no dan información directa y cuantitativa. Otro grupo de técnicas electroquímicas son **los microelectrodos analito-selectivos**, usados ampliamente para caracterizar las condiciones bioquímicas dentro de la biopelícula como pH y concentración de oxígeno, sulfuro, nitrato y amonio (Nivens y col. 1995). Este tipo de técnicas han sido aplicadas a nivel de laboratorio y tienen como desventaja su fragilidad y el hecho de que requieren calibración frecuente, por lo que su uso a nivel industrial parece ser poco probable.

La resistencia eléctrica y la resistencia de polarización lineal son técnicas usadas en el seguimiento de la CIM. Mientras la resistencia eléctrica mide la velocidad de acumulación de la corrosión, la resistencia de polarización lineal mide la corriente de corrosión, la formación de la biopelícula tiende a contrarrestar estas dos resistencias. Ambos métodos requieren la aplicación de una corriente y, por lo tanto, podrían ocasionar cambios en la biopelícula por lo que los resultados no son fiables.

Otro tipo de medidas englobadas en las señales electroquímicas son **las medidas de capacitancia e impedancia**. En lo relativo a la electricidad, las células vivas pueden considerarse como una membrana cerrada con aislamiento, llena de líquido plasmático, que presenta características dieléctricas, haciendo que se comporten como condensadores eléctricos capaces de almacenar cargas (es decir, iones que se mueven hacia las membranas celulares) cuando se exponen a un campo eléctrico. Para que estas cargas sean almacenadas, estos iones se mueven dentro de un campo eléctrico provocando una corriente eléctrica que fluye. Esta corriente puede ser detectada al medir la capacidad eléctrica del campo eléctrico creado. Para detectar la biomasa con esta técnica se usa la espectroscopía dieléctrica, espectroscopía de admisión eléctrica o la medida de capacitancia. El intervalo de detección de la técnica fue del orden de 10^8 unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado (UFC/cm²) en cultivos mixtos (Jass y col. 1995). Un hecho interesante es que sólo las células vivas son capaces de cambiar los sistemas de capacitancia, mientras que las células con daño de membrana no dan señales significativas. La espectroscopía de impedancia eléctrica es una técnica que consiste en medir la impedancia eléctrica (relación entre la tensión y la intensidad) de un medio a varias frecuencias. En un medio biológico, la impedancia tiene un comportamiento específico, dependiente de la frecuencia de la corriente aplicada y diferenciable, del que muestran medios sin células o con

células muertas. Su limitación está en el límite de detección, ya que sólo detecta biopelículas con grosores de más de 200 μm , además su interpretación no es fácil y sólo se ha usado a nivel del laboratorio (Cristiani y col. 2002).

Señales de vibración

Este método se basa en el uso de vibraciones mecánicas en líquidos o cuerpos sólidos para detectar la presencia de las biopelículas. Existen dos tipos de medidas : (i) sensores en los que crece la biopelícula, donde las vibraciones se transmiten a través de la rigidez de la estructura de la biopelícula, y (ii) sensores que trabajan como sónares creando pulsos acústicos dentro de la fase líquida, y haciendo seguimiento del eco que se pueda producir en las paredes y sus modificaciones. **Los sensores de fase sólida** miden las vibraciones mecánicas en contacto directo con la biopelícula. Estos sensores son, normalmente, cristales piezoeléctricos. Esta técnica mide la variación de la frecuencia de la resonancia, determinada por cambios eléctricos a nivel de los cristales. Los más conocidos hasta ahora, son las microbalanzas de cristal de cuarzo. El límite de detección de la técnica es de 3×10^5 células/ cm^2 y su limitación radica en que la rigidez de las biopelículas es limitada y las capas más altas no contribuyen al resultado. **Los sensores de fase líquida** aprovechan la capacidad de las superficies lisas para crear ecos acústicos fuertes, mientras que las estructuras blandas y superficies irregulares, como las biopelículas, atenúan efectivamente el sonido. La técnica se empleó para el estudio de la formación de biopelícula de la *Pseudomonas aeruginosa*. El estudio demostró una correlación entre la amplitud de reflexión y la concentración de EPS, una vez la biopelícula alcanzó una concentración de 35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, por lo que no detecta la etapa inicial de formación de biopelícula.

En resumen la mayoría son técnicas no invasivas y permiten hacer un seguimiento de la formación de la biopelícula, pero en algunos casos la obtención de datos y su posterior análisis son difíciles. Además, en algunos casos, el límite de detección no permite valorar las etapas iniciales de formación de especial relevancia en los tratamientos de control, ya que el control de esta etapa garantiza la efectividad del tratamiento. Ninguna de las técnicas mencionadas anteriormente puede aplicarse de forma universal, pero proporcionan información valiosa de la estructura y comportamiento de la biopelícula en diferentes sistemas acuáticos.

2 Necesidades de investigación y objetivos de la tesis doctoral

Esta tesis doctoral se centra en la búsqueda de medidas que permitan prevenir o mitigar el efecto nocivo de los microorganismos en el proceso de producción de papel. El análisis del estado del arte muestra la importancia del conocimiento de los problemas ocasionados debido a la presencia de microorganismos y se detectan las siguientes necesidades de investigación:

- La heterogeneidad de las poblaciones presentes en las diferentes fábricas así como su presencia o ausencia están condicionadas por diferentes factores ambientales. Las investigaciones demuestran que es imprescindible realizar el estudio de cada fábrica por separado para conocer sus especies predominantes permitiendo seleccionar el tratamiento más adecuado. **Por lo que se requiere hacer un estudio de las cepas predominantes en el proceso de fabricación de papel en España.**
- El uso indiscriminado de todo tipo de biocidas acarrear problemas medioambientales ocasionados por la presencia de sustancias tóxicas en los vertidos. Hasta hace muy poco tiempo agravaban los problemas microbiológicos en la industria papelera, ya que los microorganismos desarrollaban mecanismos de resistencia frente a los diferentes compuestos empleados. **Por lo que se hace imprescindible la búsqueda de tratamientos alternativos que sean efectivos en el control de la actividad microbiana y que no provoquen efectos adversos.**
- La aplicación de programas de control requiere el empleo de técnicas adecuadas que nos permitan cuantificar los efectos de los productos sobre la formación de la biopelícula. El estudio del estado del arte demuestra que existen una gran cantidad de técnicas aplicadas a tales efectos. La mayoría de estas técnicas son aplicadas únicamente a nivel de laboratorio, de otra parte, las que se han aplicado a nivel industrial tienen inconvenientes con los límites de detección, lugar de aplicación, y el análisis de resultados. **Existe, por lo tanto, la necesidad de una técnica de seguimiento que permita cuantificar los efectos de los productos de control sobre la biopelícula, sin manipulación de la muestra, de forma rápida, sencilla y además, que la técnica pueda ser aplicada tanto a nivel de laboratorio como a nivel industrial.**

- Otro punto clave en la aplicación de los programas de control es el seguimiento de la viabilidad celular de los microorganismos problemáticos, ya que de ellos depende el desarrollo de los posibles mecanismos de resistencia frente a los productos control. Los métodos de seguimiento aplicados en la actualidad, valoran la efectividad de los productos por la cantidad de microorganismos que crecen en medios sólidos, pero no evalúan la presencia de microorganismos no cultivables. **Falta desarrollar una técnica que permita hacer un seguimiento rápido de la viabilidad celular en suspensiones bacterianas, para determinar los efectos de los productos de control.**

De acuerdo a las necesidades de investigación previamente descritas, se han establecido los siguientes objetivos de investigación:

- **Detectar y caracterizar las bacterias formadoras de biopelícula en las fábricas de papel españolas.** Se trata de identificar las especies principales que forman parte de las poblaciones microbianas presentes en un proceso de fabricación de papel y desarrollar métodos rápidos para su identificación (**publicaciones I y II**).
- **Evaluar nuevos tratamientos que permitan controlar los problemas ocasionados por la presencia de microorganismos.** El uso de los biocidas está cada vez más restringido por su alta toxicidad, por lo tanto, es necesario identificar nuevos compuestos que controlen la actividad microbiana, sin ocasionar daños colaterales en el entorno donde se encuentra ubicada la fábrica (**publicaciones III, VI y datos no publicados**).
- **Desarrollar una técnica que permita hacer un seguimiento de los efectos de los productos de control sobre la formación de la biopelícula.** Determinar las ventajas potenciales de una técnica que hace el seguimiento de forma continua, lo que permite hacer frente a alteraciones en el comportamiento de los microorganismos y realizar un seguimiento de la eficacia de las medidas tomadas, para evitar los problemas ocasionados (**publicación IV**).
- **Estudiar la viabilidad celular de los microorganismos, considerados problemáticos.** El concepto de viabilidad celular es fundamental y proporciona información valiosa, para entender el efecto y desarrollar nuevos productos de control (**publicación V**).

3 Materiales y métodos

3.1 Microorganismos

Con el fin de investigar dos de los problemas más frecuentes ocasionados por los microorganismos en la industria papelera, en esta tesis doctoral se utilizan dos tipos de microorganismos: microorganismos formadores de biopelículas y microorganismos productores de olor.

Para el estudio de los microorganismos formadores de biopelículas se seleccionaron muestras de biopelículas (comunidades mixtas) y cepas aisladas procedentes de dos fábricas ubicadas en España y en Finlandia, en las cuales se usa 100% papel recuperado como materia prima.

Las muestras de biopelículas, se tomaron de la superficie de la tela de formación con espátulas estériles y se colocaron en contenedores con solución salina fisiológica estéril para su transporte, dejando suficiente aire para evitar condiciones anaerobias. Las muestras fueron procesadas antes de 2 h de su recogida.

El criterio de selección de las cepas se basó en su alta producción de EPS (Rattö y col. 2006). Las cepas aisladas fueron: *Brevundimona vesicularis* (E-981024), *Citrobacter* sp. (E-011941), *Enterobacter* sp (E-011940, E-011942 y E-011943), *Bacillus megaterium* (E-22115), *Enterobacter cloacae* (E-022114 y E-022119), *Enterobacter aerogenes* (E-22118), *Raoultella planticola* (E-022116) y *Klebsiella pneumoniae* (E-11927). La identificación se realizó por caracterización bioquímica, empleando los sistemas API (Biomerieux S.A.), ribotipificación y secuenciación parcial de ADNr 16S (alrededor de 450 nucleótidos). Otras cepas que se incluyeron en el estudio fueron: *Klebsiella oxytoca* (DSZ-2), aislada del suelo e identificada por el análisis de secuencia genética de la fracción 16rARN y *Pantoea agglomerans* (CECT 850), obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Estas cepas se emplearon para verificar la especificidad de las sondas FISH.

También se estudiaron muestras de biopelículas formadas en un sistema de flujo continuo de laboratorio detallado en el apartado 3.3. Estas muestras se recogieron después de 3 días de crecimiento sobre los cupones (superficie empleada para la adherencia y posterior formación de biopelícula).

En el caso del estudio de microorganismos formadores de olor se escogieron cinco cepas identificadas como productoras de olor, además de formar biopelículas. Estas cepas pertenecen a la colección de cultivos tipo del centro de biotecnología VTT, y se aislaron de fábricas de papel de Finlandia y de España en trabajos anteriores. Los microorganismos se escogieron por el tipo de metabolito producido causante del olor: *Streptomyces albus* (E-95630), productor de metilsoborneol y geosmin

(Merdsker y col. 1969, Gerber 1983, Blevins y col. 1995, Sugiura y col. 1997, Sugiura y col. 1998); *Bacillus licheniformes* (E-95602), productor de 3-metil-3-sulfanil hexano-1-ol (Trocaaz 2004); *Acinetobacter baumannii* (E-981142), *Citrobacter freundii* (E-96692) y *Klebsiella oxytoca* (E-95642), bacterias heterotróficas que, al descomponer la materia orgánica, producen compuestos sulfurosos. Estas cepas se preservaron en micro-viales a $-80 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Las condiciones de cultivo se resumen en la tabla 3.

Tabla 3.- Condiciones de cultivo de las cepas formadoras de olor.

Microorganismos	Temperatura (°C)	Medio de cultivo
<i>Streptomyces albus</i>	45°C	Triptona soja
<i>Bacillus licheniformes</i>	37°C	Caldo nutritivo
<i>Klebsiella oxytoca</i>		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	30°C	
<i>Citrobacter freundii</i>		

3.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en la investigación fueron: medios complejos y aguas obtenidas del proceso de fabricación de papel:

- Medio complejo VTT, compuesto por glucosa: (20 g/L), extracto de levadura (0,5 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,6 g/L), KH_2PO_4 (3,18 g/L), K_2HPO_4 (5,2 g/L), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3 g/L), CaCl_2 (0,05 g/L), $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mg/L), $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mg/L), $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (0,2 mg/L), $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,6 mg/L) y CoCl_2 (0,2 mg/L).
- Medio Triptona soja, que contiene triptona: (17 g/L), soja (3 g/L), dextrosa (2,5 g/L), NaCl (5 g/L) y K_2HPO_4 (2,5 g/L).
- Caldo nutritivo, que contiene: extracto de carne (1 g/L), peptona (5 g/L) y extracto de levadura (2 g/L).
- Agua de peptona salina, que contiene: peptona de carne 10 g/L y NaCl 5 g/L.
- Aguas de proceso recogidas de la zona húmeda de la máquina de papel. Estas aguas se transportaron a 15 $^{\circ}\text{C}$ y se usaron antes de que se cumplieran dos horas de su recogida. Las aguas de proceso fueron secuencialmente filtradas a

través de filtros de: 1 mm, 600, 400, 200 y 63 μm , reproduciendo el tratamiento de filtración empleado en la fábrica para obtener aguas clarificadas.

3.3 Sistemas de flujo continuo

Para el estudio de la formación de la biopelícula, se diseñaron dos biorreactores con sistemas de flujo continuo de diferente volumen: 10 L y 300 mL (B10 L y B300 mL, respectivamente). Cada sistema está constituido por un reactor de tanque agitado abierto, dos cámaras de flujo laminar para alojar los cupones de muestreo, una bomba centrífuga para la recirculación del agua y dos bombas peristálticas para cambiar el agua de alimentación (Fig. 5). Los tanques están abiertos, para permitir la transferencia del oxígeno del aire en el medio de cultivo de forma similar a como ocurre en la fábrica. Cada cámara de flujo contiene 10 cupones de PVC con espacios de 5 mm entre ellos para una mejor manipulación.

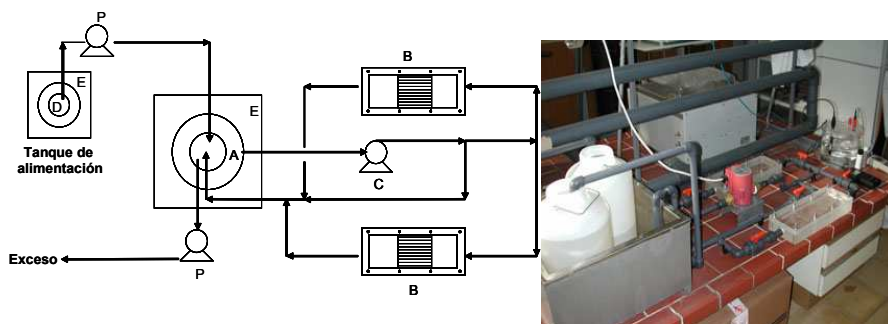


Figura 5.- Sistema de flujo continuo: (A) tanque agitado, (B) cámara de flujo con cupones, (C) bomba centrífuga, (D) tanque de alimentación, (E) baño isotérmico y (P) bomba peristáltica.

El B300 mL se diseñó para los primeros ensayos con los productos enzimáticos, ya que en algunos de los casos se contaba con muy poca cantidad de muestra de enzima.

3.4 Tratamientos de control

En estos experimentos se incluyeron tres tipos de productos comerciales (suministrados por Buckman Laboratories): biocidas (Butrol 1009®, Butrol 1072®, Butrol 1130® y Butrol 881®), dispersantes (Busperse 235®) y enzimas (Buzyme®) (tabla 4).

Tabla 4.- Compuestos y enzimas inhibidores de la formación de biopelícula aplicados sobre bacterias formadoras de biopelículas.

Tratamiento	Butrol 1130®	Butrol 881®	Butrol 1072®	Butrol 1009®	Buzyyme®	Busperse®
Principio activo	BHAP*	Tiocarbonato	TCMTB** + MTC*** diluido	TCMTB** + MTC***	Proteasa	Dispersante
Mecanismo de acción	2	2	1, 2	1, 2	Enzimático	Dispersión

BHAP*: Bromohidroxiactofenona → efecto 2 (Inhibición directa del metabolismo)

TCMTB**: Thiocianometilbenzotiazol → efecto 1 (Complejamiento de metales).

MTC***: Metilenebistiocianato → efecto 2.

Por otra parte, se estudió el efecto de 19 productos enzimáticos comerciales (suministrados por Novozymes® A.S.) no desarrollados específicamente para el control de biopelículas, con el fin de identificar principios activos capaces de degradar o inhibir este tipo de depósito. Los principios activos de los productos enzimáticos se detallan en la tabla 5.

Tabla 5.- Productos comerciales enzimáticos y sus principios activos.

Producto	Principales componentes enzimáticos
Bio-feed Beta L®	Alfa-amilasa, beta-glucanasa, celubiasa, celulasa,
Cereflo 200 L®	Beta-glucanasa
Denilite®	Lacasa
Dextranase 50 L®	Dextranasa
Energex L®	Xylanasa, beta-glucanasa, hemicelulasa,
Fructozyme L®	Inulinasa
Gammanase®	Gamanasa
Glucanex®	Beta-glucanasa
Gluzyme 10000 BG®	Catalasa, glucosa oxidasa
Kojizyme®	Endo-peptidase, exo-peptidase, aminopeptidase,
Novozyme 863®	Poligalacturonasa , Actividades pectolíticas y hemicelulolíticas
Pectinex Smash®	Varias actividades pectinolíticas
Peelzyme I®	Pectinasa, arabinasa, celulasa, hemicelulasa, poligalacturonasa
Pulpzyme HC ®	Xilanas
Terminox®	Catalasa
Ultraflo L®	Beta-glucanase, arabinase, cellulase, xylanasa
Viscozyme® L®	Pectiniliasa, celulasa, hemicelulasa, poligalacturonasa
Pectinex Ultra SP®	Mezcla de enzimas pectinolíticas
Novoshape®	Pectin metilestearasa

Además, se estudiaron los efectos de 5 biodispersantes, suministrados por los laboratorios KOLB.

Finalmente, se estudiaron los efectos de una nueva enzima desarrollada específicamente para la degradación del ácido colánico,

compuesto que, como se ha indicado, hemos identificado en numerosas biopelículas tanto en España como en Finlandia.

3.4.1 Ensayos preliminares

Los cultivos puros de las bacterias seleccionadas, se incubaron en 250 mL en medio de agua de peptona salina durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, a una alícuota de 100 mL de cada cultivo se le adicionaron 100 ppm de los productos de control (Tabla 4). El estudio de los efectos se basó en el análisis de la viabilidad de los microorganismos a diferentes tiempos (0, 2, 8 y 24 h) por citometría de flujo (el estudio se describe en el apartado 3.6).

3.4.2 Ensayos con productos enzimáticos comerciales

Ensayos en el biorreactor B300 mL

Antes de iniciar la experimentación, el biorreactor y los cupones se lavaron con detergente y etanol, y luego se aclararon con agua destilada estéril. Los cupones se colocaron en la cámara de flujo.

El biorreactor se inoculó con las aguas obtenidas de la zona húmeda de la máquina de papel. Los experimentos se llevan a cabo a pH controlado entre 6,8 y 7,0 a 30°C durante 4 días. Se adicionó una dosis de 1000 ppm de enzima. Al inicio de la experimentación, en cada ensayo, la cámara de flujo se abrió cada 24 h para extraer dos cupones. Uno de los cupones se usó para cuantificar la formación de biopelícula. Esta medida se basó en el peso seco (mg/cm^2) después de 6 h a 105°C. El otro cupón se usó para medir las unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado del cupón (UFC/cm^2).

Para realizar las medidas anteriores, los cupones se tratan en condiciones estériles. Las biopelículas se retiraron con un escobillón de algodón estéril y transferido a un vial que contenía un volumen conocido de solución salina fisiológica. Esta suspensión se agitó durante 20 s para dispersar las células. Luego, con cada muestra obtenida, se realizaron diluciones seriadas para cuantificar el número de colonias en medio sólido de agar para conteo. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 h. El medio acuoso se extrajo en condiciones estériles a intervalos similares y se determinaron las UFC/mL. Los resultados de estos ensayos permitieron seleccionar tres tratamientos para realizar estudios más detallados en el biorreactor B10 L.

Ensayos en el biorreactor B10 L

El B10 L se inoculó con las aguas de proceso de la parte húmeda de la máquina de papel. Los experimentos se llevaron a cabo durante 4 días. Las muestras de agua y los cupones se extrajeron cada 24 h. El tratamiento enzimático se añadió al inicio de la experimentación en dosis de 1000 ppm del producto correspondiente. Las medidas se realizaron siguiendo el procedimiento explicado en los ensayos anteriores.

Además, se realizaron cálculos para conocer el ratio de colonización CR, de acuerdo a las ecuaciones (1-4). Donde, C se define como la suma total de UFC/cm² en el cupón A y el total de UFC en el medio B. SC es la superficie del cupón (cm²) y VTL es el volumen total de líquido en el biorreactor (mL).

De esta manera, se pudo comparar los resultados de los experimentos con diferentes condiciones de partida (Kielemoes y col. 2002).

$$CR (\%) = (A/C) \times 100 \quad [1]$$

$$C = A + B \quad [2]$$

$$A = \text{UFC/cm}^2 \times SC \quad [3]$$

$$B = \text{UFC/mL} \times VTL \quad [4]$$

Finalmente, los resultados de estos ensayos permitieron seleccionar el mejor producto para continuar la experimentación.

Ensayos en el circuito piloto

Para identificar el compuesto activo que interviene en el control de la biopelícula, se probaron dos productos comerciales que contienen diferentes fracciones del producto activo del Pectinex Smash®, producto seleccionado en los estudios anteriores. Este conjunto de experimentos se llevó a cabo en un circuito piloto, que simula el circuito de agua de proceso en una fábrica de papel. El circuito piloto consistió en dos biorreactores de Bio-Flo3000®, fabricados por New Brunswick Scientific (EE.UU.), uno de ellos se usó para probar el efecto de los tratamientos, y el otro como control. Las condiciones de trabajo fueron: temperatura de 45°C, pH 7, oxígeno disuelto hasta un 20% y régimen turbulento. Los cupones se introdujeron en cada biorreactor para permitir la formación de depósitos. Las aguas de proceso se filtraron por el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.2.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado para poner a prueba la efectividad del tratamiento enzimático contra la formación de biopelícula. La enzima se añadió continuamente durante 10 días desde el principio hasta el final del experimento para mantener una

concentración constante de enzima de 1.000 ppm. Cada día, el número total de UFC se evaluó mediante el método de la película seca-rehidratable (Petrifilm3M™). Los resultados del recuento se expresan como UFC/mL. Al final del experimento, se pesó la cantidad total de materia seca de la biopelícula formada en los cupones.

Para excluir el efecto de componentes no enzimáticos sobre el control de la biopelícula, una parte del producto se sometió a 121°C, durante 30 min para desnaturalizar la enzima. La enzima inactiva se añadió continuamente durante la prueba para mantener constante la concentración de 1.000 ppm, y los efectos se compararon con un experimento de control sin enzima.

Por otro lado también se estudió el efecto de diferentes dosis (1, 10 y 100 ppm) del producto que mostró una mayor eficacia en el control de la formación de biopelículas. Estos ensayos se realizaron en los circuitos limpios. El mejor tratamiento se aplicó de forma continua en tres biorreactores alimentados con aguas de proceso. Se utilizó un cuarto biorreactor sin tratamiento como control.

3.4.3 Ensayos con la nueva enzima desarrollada

De las 18 cepas aisladas de muestras de biopelículas de la máquina de papel, las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* presentaban en común la producción de ácido colánico. Basados en esta observación, junto con los laboratorios de biotecnología VTT (Finlandia), la Universidad de Waheningen (Holanda) y nuestro grupo de investigación, se desarrolló la enzima Colanasa que degrada este tipo de EPS (datos no publicados).

El ensayo con la nueva enzima desarrollada se realizó en el biorreactor B300 mL. En el biorreactor se añadieron 300 mL de aguas de proceso y se inoculó con las cepas del apartado 3.1. Los ensayos se realizaron separando las cepas de acuerdo al sitio donde se aislaron y cultivadas de forma mixta. Las condiciones experimentales se mantuvieron a lo largo del experimento: el pH se mantuvo entre 6,8 y 7,2 para evitar los efectos causados por la deacetilación, y la temperatura a 30°C.

La dosis de la enzima fue de 50 ppm, que corresponde a 400 UI aproximadamente. La dosis se añadió al inicio de la experimentación. El seguimiento de la formación de la biopelícula se realizó de forma similar a los anteriores ensayos y se caracterizó, además, por microscopía confocal.

3.4.4 Ensayos con biodispersantes

Generalmente, un aspecto importante para describir las interacciones de biopelículas mixtas es evaluar las especies de forma individual

definiendo la capacidad del microorganismo o biopelícula a persistir o crecer en un entorno determinado o bajo un estrés ambiental en particular debido a la presencia de agentes antimicrobianos (Burmolle y col. 2006).

Para realizar los ensayos con biodispersantes se siguió el protocolo sugerido por la casa comercial. Los viales de las cepas congeladas se transfirieron a 100 mL de medio de cultivo adecuado, se incubó durante 17 h a la temperatura óptima para cada cepa y se diluyó a 1:100 en el medio deseado para obtener una concentración de aproximadamente 10^7 células/mL.

La concentración de bacterias también se calculó por recuento en placa. Para calcular el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), esta suspensión se agitó durante 20 s para dispersar las células, y se realizó una serie de diluciones que se sembraron en agar de recuento en placa. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h y después, se determinó el número UFC/mL.

La dilución de bacterias (10^7 células/mL) se inoculó en microplacas de 96 pocillos repartidos en columnas de 8 pocillos sucesivos. Cada pocillo se inoculó con 200 µL de la dilución; a excepción de las dos primeras y las dos últimas columnas.

Las columnas 1 y 12 se dejaron sin medio, ya que al estar en la posición más externa, se pueden evaporar o contaminar más fácilmente. Las columnas 2 y 11 fueron inoculadas con medio de cultivo sin microorganismos (Fig. 6). Estas columnas se usaron como control de contaminación. Para cada microorganismo, se prepararon dos microplacas con el fin de determinar la eficacia de los biodispersantes en la etapa de formación de la biopelícula y su efecto sobre la degradación de la biopelícula ya formada.

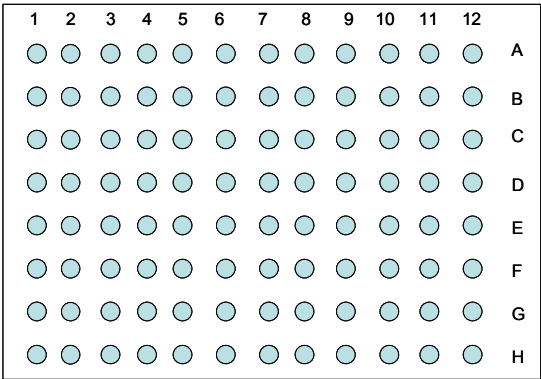


Figura 6.- Distribución de los pocillos en la microplaca.

Una vez que las microplacas se inocularon con el microorganismo, en una de ellas, se adicionó en cada pocillo 20 µL de de disolución de

biodispersantes con diferentes concentraciones (3,6 ppm, 7,1 ppm, 10,6 ppm, 14,1 ppm, 24,6 ppm, 35,0 ppm, 68,06 ppm y 100,9 ppm). Luego, las microplacas se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm durante 24 h cada una a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo que contenía. La segunda microplaca se incubó sin biodispersante durante 24 h para obtener formación de biopelícula. Una vez cumplido este tiempo, se añadieron las mismas concentraciones de biodispersante que en el ensayo anterior.

Los experimentos se llevaron a cabo durante un período de 3 días. Cada día se determinó la densidad óptica para comprobar el crecimiento de los microorganismos. Al final del experimento, la biopelícula formada sobre los pocillos de las microplacas se tiñó con cristal violeta para cuantificar de forma indirecta el efecto de los biodispersantes sobre la biopelícula que se había formado inicialmente.

Las microplacas se analizaron con el lector de placas Genios XFLUOR4. La reproducibilidad se evaluó sobre la base de la desviación estándar para cada experimento (6 pocillos para cada concentración de biodispersante). La formación de biopelícula se valoró de forma indirecta con la medición de la absorción del cristal violeta a 595 nm.

3.5 Medidas de densidad óptica

La evolución de la biomasa se determinó mediante la medida de densidad óptica del medio de cultivo durante el crecimiento bacteriano. Para ello se empleó el espectrofotómetro modelo AQUAMATE de Thermoscientific. Los datos se convirtieron a peso seco mediante la correspondiente curva de calibración, obtenida a partir del seguimiento del cultivo durante 24h. Los resultados se expresan como g/L.

3.6 Citometría de flujo

La citometría de flujo se realizó con el citómetro de flujo FACS-Scalibur de Becton Dickinson (BD) San José, CA, USA. El citómetro está equipado con un láser ión-Argón y tres fotomultiplicadores con filtros de paso de banda de 530 nm (FL1), 585 nm (FL2) y >650nm (FL3). Los datos se adquirieron y se analizaron con el programa CellQuest PRO (BD). Se adquirieron un total de 10.000 eventos y el flujo del citómetro fue bajo para evitar el daño celular. Este equipo se usó en dos estudios realizados durante la tesis doctoral: (i) estudio de los efectos de seis productos control empleados en los ensayos preliminares y (ii) en el desarrollo de modelos cinéticos basados en la viabilidad celular. La fluorescencia emitida por el yoduro de propidio (IP) se recoge a través del filtro FL3 y las fluorescencias del SYTO 13 y naranja de tiazol (NT) se recoge a través del filtro FL1.

Para los ensayos preliminares se emplearon dos fluorocromos: el IP de SIGMA y el SYTO 13 (Molecular Probes). El IP se utilizó como marcador de viabilidad por exclusión, ya que es una molécula de gran tamaño con doble carga positiva que se une al ADN y al ARN y no puede penetrar en las células con membranas citoplasmáticas intactas (Joux y LeBaron 2000, Novo y col. 2000, Shapiro 2003). La tinción de las células con IP es, por lo tanto, indicativa de daño en la membrana y, en consecuencia, el IP se ve normalmente como un indicador de la muerte celular (Lisle y col. 1999, Berney y col. 2006), aunque existen algunas excepciones (Novo y col. 2000, Shi y col. 2007). El SYTO 13 pertenece a la familia de colorantes de cianinas y se usa como marcador de supervivencia celular. Este fluorocromo al igual que el IP se une a los ácidos nucleicos, pero es capaz de atravesar las membranas celulares intactas.

Las concentraciones de los fluorocromos utilizadas fueron 0,1 µg/mL de IP y 2,5 µL de SYTO13. Estas concentraciones se añadieron a 1mL de la muestra y se incubaron durante 10 min en total oscuridad a 37°C. Los análisis consistieron en la comparación de las intensidades de fluorescencia de los dos fluorocromos. Se cuantificaron los diferentes estados celulares en porcentajes.

En el caso de los modelos cinéticos, los fluorocromos usados durante la experimentación pertenecen al kit de viabilidad celular de BD. Este kit contiene IP, NT y microesferas fluorescentes en tampón con azida sódica al 0,1% usadas como patrón para el conteo celular.

El NT es un colorante permeable que presenta afinidad por el ADN y por los lípidos de la membrana celular, lo que le permite penetrar en las células que tienen su membrana intacta (Xiaofeng y Krull 2005). La presentación comercial tiene concentraciones en 500 µL de producto para IP de 4,3 mM en agua y para el NT 4,2 µM en DMSO.

3.7 Hibridización in situ con marcadores fluorescentes (FISH)

La técnica de hibridación *in situ* está basada en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para hibridarse entre sí por pares complementarios. La detección bacteriana de las muestras aisladas de la industria papelera se realizó basándose en las secuencias 16S ADNr de los diferentes géneros de *Enterobacteriaceae*, encontrados en la base de datos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) y teniendo en cuenta el programa ARB (<http://www.arb-home.de>, Kumar y col. 2005). Las sondas (secuencias de ADN de una sola hebra) se sintetizaron por Transgenomic (UK).

En este caso se diseñaron tres sondas específicas:

- La sonda KPN- 1 (5'- AAGGCGTTAAGGTTAATAA-3').

- La sonda ENT-1 (5'-CAGCAATTGACGTTAC-3').
- La sonda ERIC-1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3').

Estas sondas se marcaron en su terminación 5' con un derivado del isotiocianato (CY3) o con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a través de un enlace covalente, y purificadas por cromatografía líquida de fase inversa.

La sonda Kempf publicada previamente (Kempf y col. 2000) 5'-CCTACACACCAGCGTGCC-3', y la sonda EUB_338 GCTGCCTCCCGTAGGAGT se usaron como control positivo para probar la eficacia de hibridación (Amann y col. 1995). Alternativamente, las muestras se marcaron con DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol) que detecta el ADN de todas las bacterias y otros microorganismos. La especificidad de las sondas se analizó con microscopía confocal.

3.8 Microscopía confocal

La microscopía confocal se usó para determinar la especificidad de las sondas de hibridación *in situ* y para caracterizar los efectos de la colanasa.

Las muestras se detectaron mediante un microscopio confocal MRC-1024 (Bio-Rad, Hempel Hempstead, UK). Los programas Lasersharp y Laserpix (Bio-Rad) se utilizaron para el análisis de imágenes.

Las sondas marcadas con FITC se excitaron utilizando un láser Ar que emite a 488 nm. La fluorescencia se recuperó a través de un filtro 515/30 BP. La sonda marcada con HEX se excitó mediante un láser de He-Ne que emite a 543 nm. La fluorescencia se recuperó usando un filtro 600/30 BP. Cuando se emplearon las sondas marcadas con FITC y HEX en la misma muestra, la adquisición de imágenes se realizó de forma secuencial.

En el estudio de los efectos de la colanasa, se empleó el blanco de calcofluor (SIGMA). La tinción se basa en la capacidad del blanco de calcofluor para unirse a los β 1-3, β 1-4 polisacáridos de la matriz de la biopelícula, y en que el compuesto exhibe fluorescencia cuando se expone a luz ultravioleta, permitiendo delinear claramente los EPS. La tinción se preparó al 2% en agua y se añadió NaOH 10M para una completa disolución, luego se esterilizó y se filtró. La tinción se almacenó a 4°C en oscuridad. Para la tinción de la biopelícula se retiraron los cupones, se tiñeron y se incubaron a 37°C durante 24 h. Luego, se analizaron con el microscopio confocal. La fluorescencia se visualizó bajo luz ultravioleta (365 nm).

3.9 Video-Microscopía Continua

Un método óptimo de seguimiento debería indicar la ubicación, la extensión y la cinética de la formación del depósito para acercarnos al conocimiento total del proceso de formación de la biopelícula. Esta información debería ser adquirida de forma continua, *in situ*, de forma no destructiva, para evitar las posibles pérdidas de biomasa, y en tiempo real, con herramientas de fácil manejo, robustas y económicas. Como se ha observado anteriormente, sólo si la formación de este tipo de depósitos se detecta en un estado inicial, las contramedidas podrían resultar más eficaces y económicas.

El sistema comercial de video microscopía continua 800-10-T12-K (PVM) desarrollado por Mettler Toledo AutoChem, toma imágenes *in situ* para el análisis de partículas y gotas, en tiempo real dentro de un reactor de proceso, vasos o tuberías, se empleó con éxito en suspensiones con concentraciones de sólidos de hasta el 60% en peso. Esta tecnología puede ser usada en el laboratorio o en línea, en una tubería (Kougoulos y col. 2005, Negro y col. 2006). Este equipo se utiliza en la industria para monitorizar el desarrollo de la cristalización y su forma (Desikan et al. 2001), pero nunca se ha aplicado al estudio de las biopelículas.

El dispositivo, que se puede insertar directamente en una corriente del proceso con una interrupción mínima del flujo consta de dos partes principales: la probeta y la caja de conexiones.

La probeta es el tubo donde se encuentra alojada la fibra óptica. Esta probeta tiene en su parte inferior un cristal de zafiro, además, en esta misma zona se encuentra un sistema óptico fijo cercano al punto de enfoque. Esto permite que el plano focal se pueda mover fácilmente para optimizar la calidad de la imagen. La caja de conexiones es la parte posterior, que nunca se inserta dentro del flujo a controlar. La probeta y la caja de conexiones están conectadas para formar una estructura rígida sellada que contenga todas las partes de la fibra óptica.

En la caja de conexiones se encuentra la fuente de luz que es un diodo láser acoplado a la fibra óptica. La luz se transporta por la fibra óptica al sistema de lentes cercano al final de la probeta. En este punto el sistema de lentes se encarga de enfocar la luz a través del área de la ventana.

Cuando el equipo detecta alguna partícula que se encuentra en el plano focal, la luz es retrodispersada y recogida para magnificar la imagen y proyectarla a un detector de imagen. Para este estudio, la probeta se modificó mediante la sustitución del cristal de zafiro por uno nuevo con dos surcos finos que favorecen la fijación de las bacterias. El equipo permite capturar dos imágenes por segundo. En este caso las imágenes tomadas corresponden a las partículas adheridas a la superficie (distancia del plano focal igual a cero). El detector genera una

imagen en blanco y negro de 850x654 μm^2 de superficie con una resolución aproximada de 3-5 μm (Hamann y col. 1998).

El intervalo de medida de esta técnica es de 5 μm a 1 mm. El intervalo de temperatura al que trabaja es de 5°C a 110°C, en casos excepcionales -90°C a 110°C.

El análisis se llevó a cabo por medio del “modulo de análisis de imagen tipo cuerda 1”, que es un rápido y simple algoritmo que calcula la distribución de longitud de la cuerda basado en un método de umbral simple. Este módulo forma parte del programa de adquisición estadística del PVM.

3.10 Modelos cinéticos

Para estudiar la relación dinámica entre los diferentes estados celulares, se utilizaron dos modelos cinéticos que consideran la evolución temporal de éstos a lo largo de su crecimiento. Estos modelos de crecimiento utilizan la ecuación logística para el ajuste de las células vivas y muertas. El ajuste de los modelos cinéticos a los datos experimentales se realizó usando el algoritmo de Marquardt-Levenberg acoplado con el método de Euler’s modificado con paso variable para la integración numérica de las ecuaciones cinéticas (Akaike 1976, Knol y col. 2010).

La selección del modelo más apropiado se basó en criterios físicos habituales (valor positivo de los parámetros cinéticos) y criterios estadísticos (valor del error estándar para cada parámetro cinético, F de Fischer, criterio de información Akaike (AIC) modificado y los valores de suma de las desviaciones residuales al cuadrado (SQR) para cada modelo cinético). Donde $Y_{\text{exp tal}}$ son los datos totales de las poblaciones obtenidos en la experimentación, Y_{cal} son los datos obtenidos por el ajuste del programa, N es la población estudiada, y K es una variable aleatoria. En este trabajo, el valor F_{95} se calculó por la ecuación (5).

$$F_{95} = \frac{\sum_{n=1}^N (y_{\text{calc}})^2 / K}{\sum_{n=1}^N (y_{\text{exp tal}} - y_{\text{calc}})^2 / (N-K)} \therefore \text{SQR} = \sum_{n=1}^N (y_{\text{exp tal}} - y_{\text{calc}})^2 \quad [5]$$

El criterio de información Akaike también corrige el uso excesivo de parámetros en cualquier modelo usado para el ajuste de los datos experimentales. Los criterios de información se crearon en los años setenta y han sido desarrollados y empleados en diferentes campos en los últimos veinte años (Knol y col. 2010, Akaike 2007, Denis y col. 1981). El criterio AIC se diseñó para conjuntos grandes de datos. Cuando la relación del número de datos con el número de parámetros es

menor de 40, es mejor aplicar una versión modificada de AIC (ecuación 6):

$$AICc = \ln\left(\frac{SQR}{N}\right) + \frac{N+K}{N-K-2} \quad [6]$$

Cuanto mayor sea F_{95} y menores sean los valores de AIC, más se ajusta el modelo desde el punto de vista estadístico a los datos experimentales.

4 Resultados

4.1 Identificación de microorganismos formadores de biopelícula

Las investigaciones realizadas para identificar las bacterias formadoras de biopelículas (BFB) en las plantas de papel y cartón, demostraron la presencia de dos tipos de microorganismos que forman parte en el desarrollo de la biopelícula: los productores primarios, que son los encargados de adherirse a la superficie, y los secundarios que colaboran de forma simbiótica para el mantenimiento de los primeros. Los formadores primarios pertenecen a diferentes géneros. Los más importantes son: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sphaerotilus*, *Citrobacter* y *Flavobacterium* (Väisänen y col. 1998, Johnsrud 2000, Gauthier y col. 2000, Oppong y col. 2000, Blanco 2003, Verhoef y col. 2005, Beuchamp y col. 2006, Rätto y col. 2006).

En el estudio realizado por Verhoef y col., en el año 2005, en colaboración con el grupo de Celulosa y Papel de la Universidad Complutense, se caracterizaron BFB de fábricas de Francia, Finlandia y España. Los resultados muestran que de 18 cepas aisladas como BFB, 16 eran miembros atípicos de la familia *Enterobacteriaceae* que pertenecen a los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Rahnella*, *Raoultella* (antiguamente *Klebsiella*) o *Serratia* y 8 de estas cepas se aislaron de las fábricas españolas, por lo que surge la necesidad de hacer un seguimiento especial de estos microorganismos en lo que se refiere a la aplicación de tratamientos de control.

Los métodos clásicos de detección de bacterias e identificación utilizados en procesos industriales consumen mucho tiempo y mano de obra. Sin embargo, el FISH es una de las más poderosas herramientas desarrolladas en ecología microbiana moderna para la detección directa y específica de microorganismos en su ambiente natural sin la necesidad de cultivar (Amann y col. 1995, 2001). Por tanto se han desarrollado sondas específicas para detectar las principales enterobacterias identificadas como más problemáticas en las fábricas de papel.

4.1.1 Diseño de las sondas de oligonucleótidos

Se han diseñado tres sondas específicas. La sonda KPN- 1 (5'-AAGGCGTTAAGGTTAATAA-3') se diseñó para marcar principalmente la región 16S ADN de las especies formadoras de biopelícula *Klebsiella pneumoniae* y *Raoultella planticola*. Esta sonda se diseñó a partir de las posiciones 434-452 del ADN que codifica la región 16S-RNA de *Klebsiella pneumoniae* y *Raoultella planticola* respectivamente (número de acceso AF130982 y AF129443).

La sonda ENT-1 (5'-CAGCAATTGACGTTAC-3'), se diseñó basándose en las posiciones 442-445 del ADN que codifica la región

16S-RNA del *Enterobacter cloacae* (número de acceso AJ251469). El diseño de las sondas también se realizó teniendo en cuenta el programa ARB (Kumar y col. 2005, BMC Bioinformatics).

La sonda ERIC-1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') marca las secuencias intergénicas consenso repetitivas del género *Enterobacteriaceae* (Hulton y col. 1991).

Estas sondas se marcaron en su extremo 5' con un derivado del isotiocianato (CY3) o con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a través de un enlace covalente y purificadas con cromatografía líquida en fase inversa.

La sonda Kempf (5'-CCTACACACCAGCGTGCC-3'), específica para *Klebsiella pneumoniae*, está dirigida a la región 23.S RNA de esta bacteria y la sonda EUB-338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'), complementaria a la región 16S ARNr, es específica para el dominio bacteriano. Estas dos sondas se utilizaron como control positivo para probar la efectividad de la hibridación (Amann y col. 1995), las sondas se sintetizaron en Transgenomic (UK). Alternativamente, las muestras se marcaron con DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol) que detecta el ADN de todas las bacterias y otros microorganismos.

4.1.2 Condiciones óptimas de hibridización

Las condiciones óptimas de hibridación se analizaron sobre cepas seleccionadas de enterobacterias: *Enterobacter cloacae* (E-022114) y (E-022119), *Enterobacter aerogenes* (E-22118), *Raoultella planticola* (E-022116), y *Klebsiella pneumoniae* (E-11927).

Toda la hibridación celular se llevó a cabo a diferentes temperaturas, con aumento en las concentraciones de formamida (desde 0 a 50% v/v, en aumentos del 10%), para determinar las condiciones de discriminación entre las células blanco y las no blanco para cada sonda. Las sondas específicas de especie y grupo se incubaron simultáneamente con la sonda EUB338. En el caso de las sondas Kempf y EUB 338, los ensayos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía (Peters y col. 2006, Kempf y col. 2000).

Las sondas que no se trataron con lisozima mostraron baja señal de intensidad de fluorescencia y baja eficiencia de hibridación. En referencia a la eficiencia del FISH, con EUB338 y las sondas específicas, el resultado mostró un incremento desde el 48±3%, en las muestras sin permeabilizar, hasta el 92±5% después de 60 min de permeabilización. Al comparar los resultados obtenidos entre los conteos realizados para muestras teñidas con DAPI y las marcadas con FISH no se detectó una diferencia significativa. La mayor eficiencia de hibridación se observó cuando los cultivos se recogieron en fase de crecimiento exponencial y bajo las condiciones de hibridación presentadas en la tabla 6.

Tabla 6.- Optimización de la hibridización celular con las sondas diseñadas.

Bacteria	Lisozima (mg.mL ⁻¹)	Formamida (%)			Temperatura (°C)		
		ERIC-1	KPN-1	ENT-1	ERIC1r	KPN-1	ENT-1
<i>E. cloacae</i> (E-022114)	1	20	-	10	57	-	37
<i>E. cloacae</i> (E-022119)	1	0	-	10	55	-	37
<i>E. aerogenes</i> (E-022118)	0,1	20	20	10	57	43	37
<i>K.pneumoniae</i> (E-011927)	0,1	20	30	-	59	40	-
<i>R. planticola</i> (E-022116)	0,1	0	30	-	55	40	-

Sin embargo, la fluorescencia con esta sonda también se observó con *Enterobacter aerogenes* (E-22118) (Tabla 7). Además de esto, la especificidad de la sonda KPN-1 se estableció con los resultados obtenidos con las otras enterobacterias ensayadas y ninguna de estas cepas se marco con la KPN-1 en los experimentos FISH. Finalmente, la sonda de género específica Kempf hibridó únicamente con *Klebsiella pneumoniae* (E-11927) (datos no incluidos)

Tabla 7.- Detección bacteriana usando las sondas desarrolladas sobre filtros de membrana con los cultivos puros.

Cepas	Fracción (%) de células totales detectadas con las sondas			
	EUB 338	ERIC-1	KPN-1	ENT-1
<i>E. cloacae</i> (E-22114)	94±1,2	91±0,2	N.D.	94 ±0,3
<i>E. cloacae</i> (E-22119)	92±0,5	89±0,6	N.D.	92±0,2
<i>E. aerogenes</i> (E-22118)	89±1,1	82±1,4	75±1,2	86 ±0,4
<i>K. pneumoniae</i> (E-11927)	97±0,9	92±1,2	96 ±1,5	N.D.
<i>R. planticola</i> (E-22116)	94±1,2	91±1,1	93 ±0,2	N.D.

ND: no detectable

Con la secuencia 16S ARNr no se pudo diseñar una sonda específica para *Enterobacter sp.* y *Pantoea agglomerans* CECT 850. De hecho, la ENT-1 es complementaria a *Salmonella entérica* y a *Citrobacter koseri* de acuerdo a la base de datos BLAST. Otras cepas *Klebsiella oxytoca*

DSZ-2 o la *Pantoea agglomerans* CECT 850 pudieron ser marcadas con esta sonda obteniendo una especificidad del $93 \pm 0,8\%$ y $97 \pm 0,2\%$, respectivamente.

Los resultados obtenidos para las BFB muestran que la mayor eficiencia para el FISH se obtuvo para las cepas de *Enterobacter cloacae* (E-22114 y E-22119). En el caso del *Enterobacter aerogenes* (E-22118) la sensibilidad es baja ($86 \pm 0,4\%$). La *Raoultella planticola* y la *Klebsiella pneumoniae* no se marcaron con la sonda ENT-1 al no pertenecer al género *Enterobacter*.

Finalmente, la sonda de Kempf específica de género sólo se hibridó con *Klebsiella pneumoniae* (E-11927) y *Klebsiella oxytoca* DSZ, de acuerdo con la especificidad descrita por Kempf y col. (2000).

La alta sensibilidad obtenida con las sondas ENT-1 y KPN-1 puede ser debida a la accesibilidad de dicha secuencia dentro de la estructura de ARNr. Así, las hibridaciones llevadas a cabo con la sonda KPN-1 demostraron su utilidad para detectar bacterias pertenecientes al grupo *Klebsiella/Raoultella*, aunque se observó fluorescencia también con *Enterobacter aerogenes* (E-22118). Sin embargo, la hibridación cruzada de la sonda KPN-1 con *Enterobacter aerogenes* no es sorprendente considerando que los estudios filogenéticos basados en la secuencia de ADNr 16S, *groE* y *gyrB* han propuesto transferir *Enterobacter aerogenes* al género *Klebsiella* (Dauga 2002). Aunque la sonda ENT-1, mostró una menor especificidad, esto no supone un inconveniente puesto que *Enterobacter*, *Pantoea* y, ocasionalmente, *Citrobacter* y *Serratia* se han descrito como formadores primarios de biopelículas (Allan y col 1999, Paterson y col. 2006).

La distinción entre los microorganismos pertenecientes al género *Klebsiella* y *Raoultella* es posible gracias al uso combinado de las sondas KPN-1 y Kempf. Además, la aplicación combinada de ENT-1 y KPN-1 permitió la identificación de *Enterobacter aerogenes*.

4.1.3 Análisis del tratamiento enzimático

El siguiente paso después del desarrollo y validación de las sondas, se centró en su aplicación sobre muestras de biopelículas, obtenidas de la máquina de papel. El experimento se llevó a cabo usando las sondas ERIC-1, Kempf, KPN-1 y ENT-1. Cada experimento se realizó 3 veces y, en cada repetición, se llevaron a cabo las hibridaciones con al menos tres triplicados. El análisis mediante FISH con la sonda ERIC-1 sobre la población bacteriana de muestras de biopelículas demostró que las enterobacterias representaban un 45% de los microorganismos totales (Figura 7).

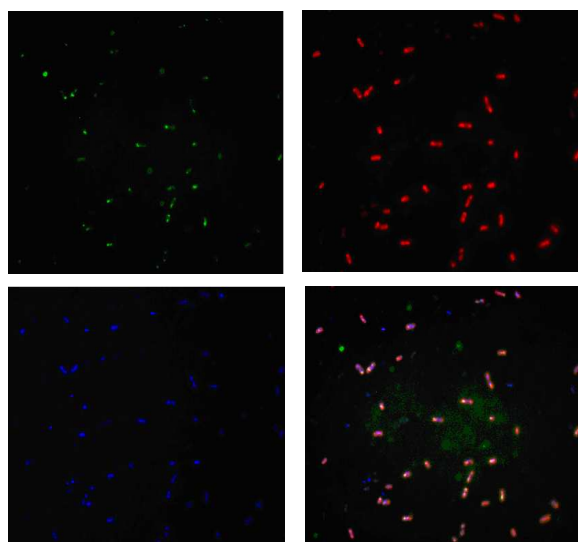


Figura 7.- Imagen de la doble hibridación de una muestra de biopelícula. La sonda ERIC-1 marcada con FITC (verde) positiva para la detección específica con bacterias. EUB 338 marcada con CY3 (rojo). ADN se tiñó con DAPI (azul).

Se comprobó asimismo la especificidad de las sondas específicas de grupo mediante la identificación en las muestras de bacterias compatibles con *Klebsiella* sp. (14-16%) y *Enterobacter* sp. o *Pantoea* sp. (12%) (Tabla 8). Además, tras el tratamiento enzimático con 100 ppm de Buzyme, no se pudieron detectar enterobacterias mediante FISH en las muestras de biopelículas, lo que demostró la eficacia del tratamiento enzimático sobre la población bacteriana, así como la utilidad del método de identificación desarrollado.

Tabla 8.- Detección de bacterias usando las distintas sondas en las muestras de biopelículas de una industria papelera.

	fracción (%) de células totales (mediante DAPI) detectadas con las sondas				
	<u>Eub338</u>	<u>ERIC-1</u>	<u>KPN-1</u>	<u>Kempf</u>	<u>ENT-1</u>
Biopelícula sin tratamiento	92±0,9	45±1,2	16±0,5	14±0,5	12 ±0,4
Biopelícula + Buzyme	-	15 ±0,3	N.D	N.D	N.D

ND: no detectada

4.2 Tratamientos de control aplicados sobre bacterias formadoras de biopelículas

4.2.1 Ensayos preliminares

Con el fin de evaluar los efectos de los diferentes tratamientos de control, se realizaron una serie de ensayos preliminares para comprobar si los resultados alcanzados a nivel de laboratorio eran similares a los obtenidos en un ensayo industrial. Se determinó el efecto de 3 tipos de compuestos antimicrobiológicos comerciales sobre la viabilidad celular de cultivos puros de *Enterobacter cloacae* (E-022114), *Enterobacter aerogenes* (E-22118) y *Klebsiella pneumoniae* (E-011927). Los tratamientos aplicados fueron:

- Agentes biocidas (Butrol 1009®, Butrol 1072®, Butrol 1130® y Butrol 881®), que atacan directamente a los microorganismos inhibiendo su metabolismo o secuestrando metales necesarios para su metabolismo.
- Dispersantes (Busperse®), que actúa promoviendo la liberación de la biopelícula de su soporte, lo que hace a los microorganismos más vulnerables frente a la acción de compuestos biocidas o antisépticos.
- Enzimas (Buzyme®), que actúan impidiendo la formación de las biopelículas, digiriendo los polisacáridos presentes en la biopelícula y, en algunos casos, dañando directamente a las células en la biopelícula.

Los estudios demostraron que no todos los compuestos usados en el control de biopelículas con una dosis de 100 ppm son igualmente eficaces. Así, Butrol 1009® y Butrol 1072® fueron los compuestos más efectivos contra las enterobacterias, puesto que permitieron obtener un 80% de células muertas tras 8 h de tratamiento, mientras que Butrol 1130® no fue tan efectivo a la dosis empleada y Butrol 881® sólo fue eficiente sobre *Enterobacter cloacae* tras 24 h de tratamiento (Fig. 8).

Por otro lado, el efecto de los dispersantes dependió de la cepa estudiada. Así, Busperse® fue muy eficiente sobre *Enterobacter cloacae* tras 2 h de tratamiento, moderadamente eficaz sobre *Klebsiella pneumoniae* a tiempos cortos (2 h) pero muy efectivo tras 24 h, mientras que no mostró eficacia ninguna sobre *Enterobacter aerogenes*.

El tratamiento con proteasa (Buzyme®) fue muy eficaz sobre *Klebsiella pneumoniae*, resultando en más del 85% de bacterias muertas tras 2 h de tratamiento, efectivo sobre *Enterobacter cloacae*, produciendo más del 75% de bacterias muertas tras 2 h y moderadamente activo sobre *Enterobacter aerogenes*.

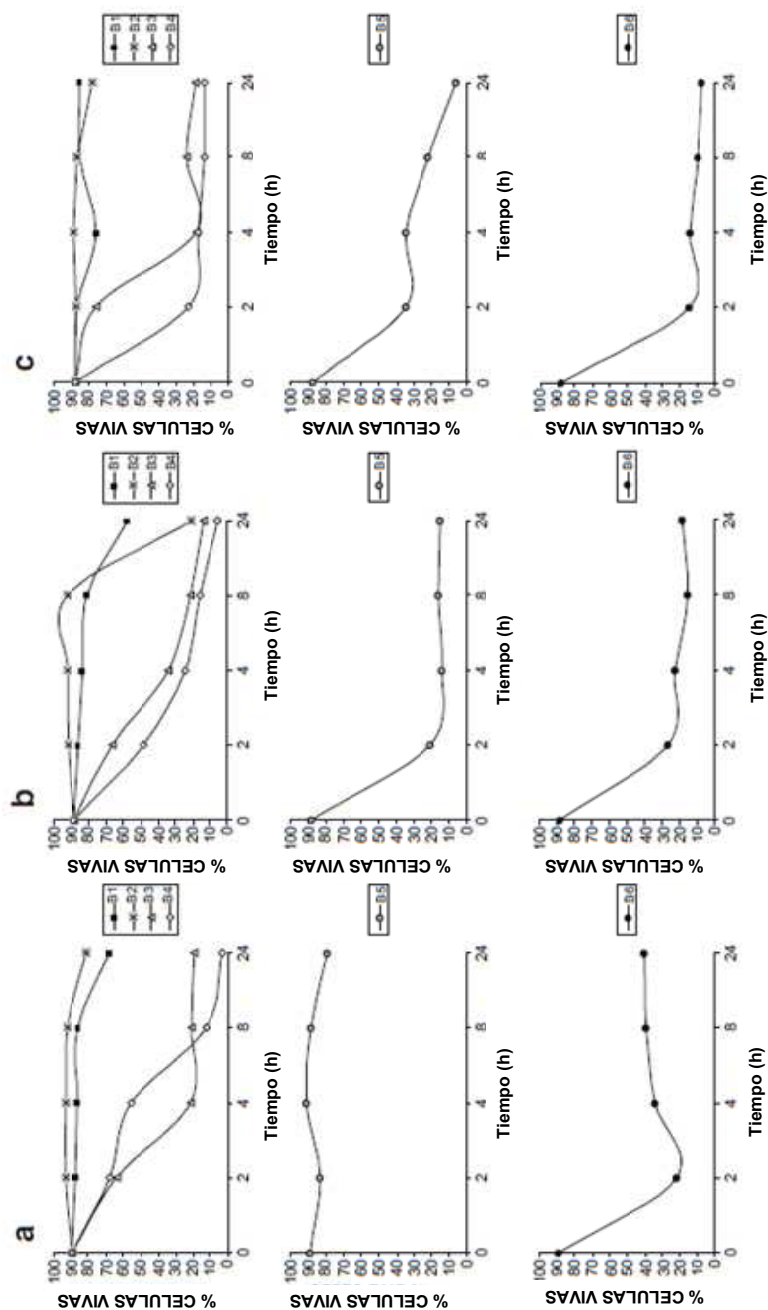


Figura 8.- Efecto de las tres clases de productos sobre las BFB E. cloacae E-022114, E. aerogenes E-22118 y K. pneumoniae E-011927. Butrol 1130(B1), Butrol 881 (B2), Butrol 1072 (B3), Butrol 1009 (B), Busperse 235 (B5) y Buzyme 2501 (B6)

En este último caso, solamente se observaron 80% de células muertas tras 2 h, aunque posteriormente se detectó un recrecimiento que llegó a alcanzar el 40% de las células vivas. Tras el tratamiento enzimático de las muestras de biopelículas, no se detectaron enterobacterias mediante FISH.

4.2.2 Tratamientos con productos enzimáticos comerciales

Como ya se ha indicado el uso de biocidas cada día está más controlado por su toxicidad y las actuales estrategias de prevención están encaminadas a la búsqueda de productos que no sean nocivos para el medioambiente y que impidan el contacto entre microorganismos y superficies y/o prevengan la colonización hasta niveles problemáticos. Uno de estos tratamientos son las enzimas. La especificidad de su mecanismo de acción complica la identificación de enzimas que sean efectivas para diferentes tipos de biopelículas. Por lo tanto las formulaciones comerciales contienen una mezcla de diferentes enzimas.

En este apartado se llevó a cabo un estudio comparativo de 17 productos comerciales enzimáticos no específicos para la prevención y degradación de la formación de la biopelícula formada por los microorganismos presentes en las aguas de proceso.

Ensayos preliminares en B300 mL

Con el objetivo de identificar compuestos activos que puedan ser aplicados al control de biopelícula en la industria papelerera, los efectos de 17 tratamientos comerciales se determinaron para una dosis de 1000 ppm y se estudiaron mediante el análisis cualitativo de los depósitos formados sobre los cupones que estaban en contacto con las aguas de proceso y que contenían la población mixta proveniente de la fábrica de papel (tabla 9).

De los 17 productos probados, Pectinex Smash® fue el más efectivo sobre la prevención de la colonización (UFC/cupón) y la formación de la biopelícula sobre el cupón (peso del cupón). Los tratamientos con Viscozyme L®, Pulpzyme®, Términox® y Bio-feed Beta L® mostraron un efecto moderado. El tratamiento con Novozyme 863® no tuvo ningún efecto sobre la formación de la biopelícula, aunque se observó que el número de UFC sobre el cupón fue bajo cuando se usó este producto, siendo éste un resultado imprevisto.

Teniendo en cuenta estos resultados, se evaluó el principio activo de los diferentes productos comerciales. El Pulpzyme® y el Bio-feed Beta L® son productos que tienen como principio activo la xilanasas. Su principal aplicación es en los procesos de bioblanqueo de la pasta (Dhiman y col. 2008). La enzima actúa sobre el xilano un polisacárido de

xilosa que es uno de los principales componentes de la hemicelulosa, por lo que afecta a la estructura de las fibras. Por lo tanto, estos tratamientos deben ser aplicados con precaución para evitar defectos en la calidad del producto final, razón por la que se descartaron.

En el caso del Terminox®, su componente activo es la enzima catalasa. Esta enzima se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo, se descartó para evitar la adaptación de los microorganismos. Por lo tanto, Novozymes 863®, Pectinex Smash® y Viscozyme L® se eligieron para continuar investigaciones.

Tabla 9.- Productos comerciales enzimáticos y efectos sobre la colonización y prevención de la formación de la biopelícula.

Producto	Colonización UFC/cupón	Prevención de biopelícula
Bio-feed Beta L®	-	++
Cereflo 200 L®	-	-
Denilite®	-	-
Dextranase 50 L®	-	-
Energex L®	+	+
Fructozyme L®	-	-
Gammanase®	-	-
Glucanex®	-	-
Gluzyme 10000 BG®	-	-
Kojizyme®	-	+
Novozyme 863®	+++	-
Pectinex Smash®	+++	+++
Peelzyme I®	-	+
Pulpzyme HC ®	++	++
Terminox®	++	++
Ultraflo L®	-	-
Viscozyme® L®	++	++

:- no efecto, +: efecto suave, ++: efecto moderado, +++ efecto fuerte.

Ensayos de laboratorio en B10 L

Los resultados obtenidos de los ensayos en el biorreactor B10 L con 1000 ppm de las enzimas seleccionadas se presentan en la figura 9. Las gráficas muestran el número de UFC en el medio , el número de UFC por unidad de superficie del cupón , el peso seco de la biopelícula sobre el cupón y el ratio de colonización.

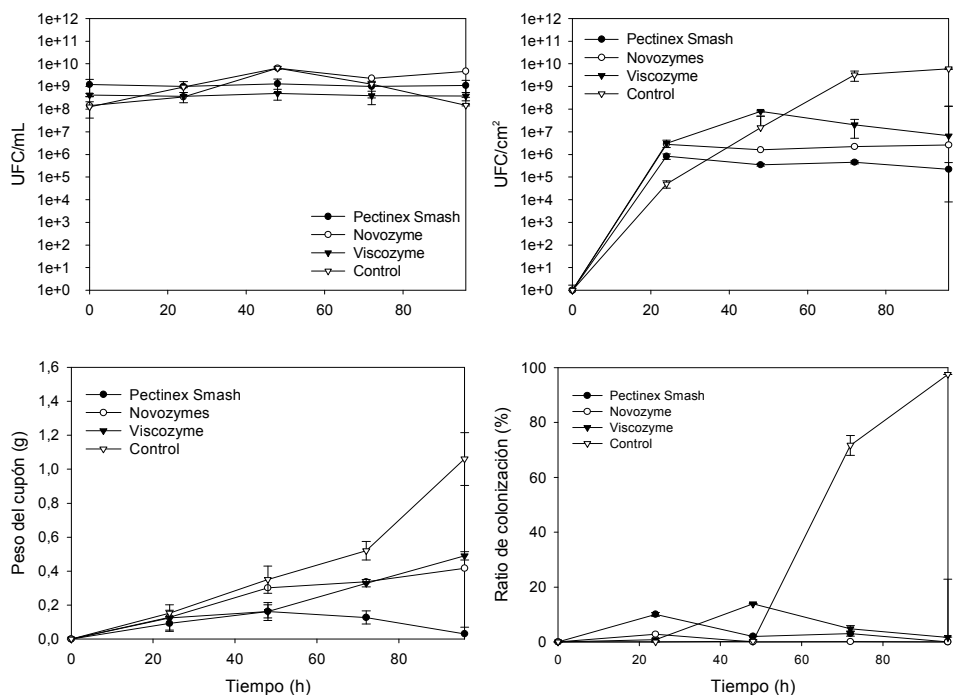


Figura 8.- Efectos de los tratamientos enzimáticos seleccionados.

La formación de la biopelícula se evaluó por un incremento del peso seco depositado sobre el cupón y por el ratio de colonización. El incremento del peso se debe a la colonización bacteriana y a su posterior producción de EPS. Un incremento en el ratio de colonización indica la formación de la biopelícula.

La adición de 1000 ppm de las enzimas probadas no modificó el valor de las UFC en el medio a lo largo de la experimentación. Los valores permanecieron constantes en todos los casos y el valor de la muestra control empleada tuvo un comportamiento similar. Esto indica que la preparación enzimática no tiene un efecto biocida sobre los microorganismos de las aguas de proceso.

Se observó que en el ensayo de control, el número de UFC sobre el cupón y el peso seco aumentaron con el tiempo, mientras que el número de UFC en el medio permaneció constante, lo que indica que la bacteria estaba activa durante el experimento. De hecho, se observa una formación de biopelícula a las 24 h que creció con el paso del tiempo. El ratio de colonización aumentó rápidamente después de 48 h y se acercó al 100% después de 96 h, demostrando que las bacterias del cupón estaban activas.

En el caso de los tratamientos enzimáticos se observó un aumento inesperado del número de UFC/cm² durante las primeras 24 h, llegando a un valor superior al obtenido para la muestra de control. Este efecto, de acuerdo a las observaciones hechas por otros autores, puede ser debido a la presencia de sustancias extrañas en el medio (sales, desinfectantes y otros compuestos), que aumentan la adherencia de bacterias y/o favorecen la maduración de la biopelícula (Jensen y col. 2007, Carpentier y col. 2004). Sin embargo, después del aumento inicial, el valor de UFC/cm² se mantuvo constante (ver los resultados de Novozyme 863® y Pectinex Smash® en Fig. 9) o incluso disminuyó ligeramente después de 72 h (en el caso de Viscozyme L®). Como resultado, la relación entre la colonización y la formación de biopelícula se mantuvo por debajo del 20% durante los ensayos con las enzimas y el número final de las bacterias que colonizaron o que crecieron en la superficie era inferior a la del ensayo control. El efecto de Novozyme 863® y Viscozyme L® sobre el peso seco de la biopelícula depositada en los cupones es significativamente menor comparado con los resultados obtenidos con Pectinex Smash®.

La adición de Novozyme 863® o Viscozyme L® no impidió la acumulación de materia orgánica en el cupón y los valores finales fueron menos de la mitad del valor alcanzado al final del ensayo control. Sin embargo, la adición de Pectinex Smash® previno la acumulación de materia orgánica y el peso de materia adherida al cupón se mantuvo por debajo de 0,2 g. Además, el ratio de colonización se mantuvo bajo durante todo el proceso, lo que implica que el tratamiento redujo la biopelícula en la superficie del cupón, limitando el número de bacterias que colonizan la superficie y reduciendo la formación de la biomasa en el cupón. Por lo tanto, el tratamiento con Pectinex Smash® se eligió para continuar el estudio a mayor escala.

Ensayos en el circuito piloto

Durante los ensayos en el circuito piloto, el número de UFC en el medio permaneció constante con valores entre 2.3×10^6 y 7×10^7 , en todos los casos. En el ensayo de control la formación de biopelícula se evidenció a partir de las 72 h, por observación visual de la superficie de los cupones.

El peso seco de la biopelícula depositada sobre los cupones en el ensayo con 1000 ppm de Pectinex Smash® fue entre 4 y 5 veces más bajo que en el ensayo control (Fig. 10). Por lo tanto, la adición de Pectinex Smash® en un circuito limpio limita la formación de la biopelícula sobre los cupones incluidos en el circuito.

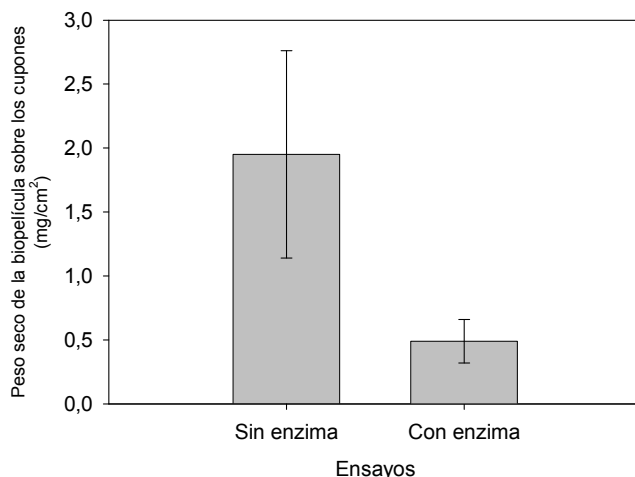


Figura 9.- Efecto de Pectinex Smash® sobre la formación de la biopelícula.

Ensayo con Pectinex Smash® desnaturalizado

Durante los experimentos con 1000 ppm de Pectinex Smash® inactivo (desnaturalizado a 121°C durante 30 min), el recuento total de bacterias en las aguas no varió significativamente (10^7 - 10^8 UFC / mL). No se observaron diferencias significativas entre el peso seco de la biopelícula depositada sobre los cupones en el biorreactor con Pectinex Smash® inactivo y en el biorreactor sin ningún tipo de tratamiento. Todos los pesos medidos en seco en los cupones después de 260 h se encontraban en el intervalo de $1,4 \pm 0,3$ mg/cm². Estos resultados sugieren que la prevención de la biopelícula obtenida con Pectinex Smash® se debió a la actividad de los componentes enzimáticos.

Identificación del componente activo

Debido a la efectividad que Pectinex Smash® mostró en los experimentos descritos anteriormente, se llevaron a cabo más pruebas para verificar su efecto contra la formación de biopelículas en el agua filtrada, que no contiene fibras, finos ni cargas minerales que puedan afectar la formación de las biopelículas.

Pectinex Smash® es un producto obtenido a partir de *Aspergillus aculeatus*, que presenta una amplia gama de actividades pectinolíticas entre las que se destaca una pectin-metilestearasa. Para identificar el compuesto activo que tiene un papel preponderante en el control de la biopelícula, se probaron en el biorreactor B10 L dos productos que contienen fracciones de las actividades de Pectinex Smash®: el Pectinex Ultra SP® (que contiene una mezcla de enzimas pectinolíticas

de *Aspergillus aculeatus*) y el Novoshape® (que contiene una pectin-metilesterasa de *Aspergillus aculeatus* como principio activo).

La figura 11 muestra el efecto logrado con 100 ppm de estos productos enzimáticos. Pectinex Ultra SP® no tuvo ningún efecto sobre la formación de biopelícula. El tratamiento con Pectinex Smash® fue eficaz para controlar la formación de biopelículas, ya que el peso de la biopelícula en seco formada sobre los cupones fue 3 veces menor que en el experimento de control. Finalmente, los resultados obtenidos con Novoshape® mostraron que el peso seco de la biopelícula en los cupones fue 4 veces menor que para el experimento de control.

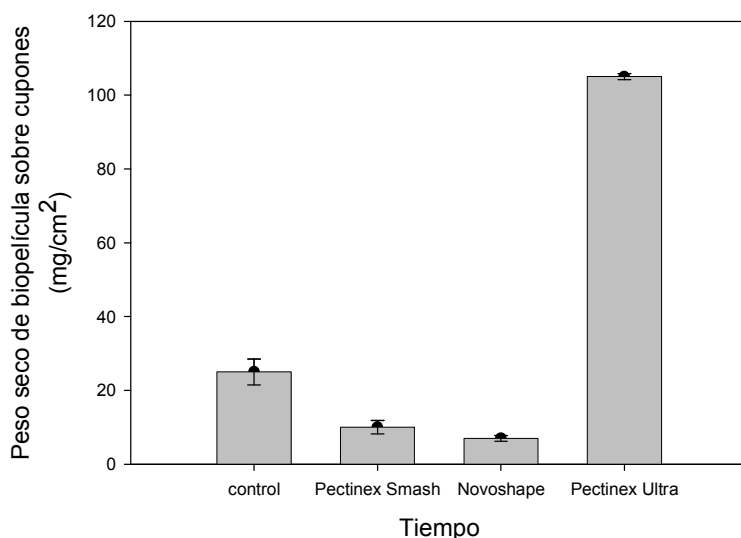


Figura 10.- Efecto de Pectinex Smash®, Pectinex ultra SP® y Novoshape ® sobre la formación de la biopelícula.

Pectinex Smash® y su fracción Novoshape® tienen en común que contienen pectin-metilesterasa perteneciente a la familia de las carbohidrato-esterasa, las cuales se encargan de catalizar la hidrólisis de los grupos metil-éster y tienen una alta especificidad sobre sustratos de pectina, una propiedad ampliamente usada en la industria alimentaria y en el estudio de las plantas (Suutarinen y col. 2002, Micheli 2001, Femenia y col. 1998).

Por tanto, se puede concluir que esta enzima fue la principal causante o, al menos, una de las enzimas responsables de la eficiencia de Pectinex Smash® sobre la prevención y el control de la biopelícula.

Orgaz y col. 2006, en su estudio sobre la eliminación de la biopelícula, concluyó que los EPS de *Pseudomona fluorescens* son fácilmente degradables por la enzima pectin-esterasa producida por el *Trichoderma viride* (perteneciente a la misma familia que la pectin-metilesterasa). Su mecanismo de acción consiste en deacetilar los EPS

de la matriz, haciéndola más suave y, posiblemente más porosa (Orgaz y col. 2006, 2007). Muchos de los EPS bacterianos tienen diferentes grupos sustituyentes, como los grupos acilos vinculados a piruvato o los grupos acetil vinculados a los ésteres. La eliminación de uno de los sustituyentes tales como el grupo acetilo, en particular el acetato, influye en las propiedades físicas de los EPS (Sutherland 1999).

La composición de los EPS bacterianos no es totalmente conocida, pero los pocos datos conocidos sugieren que algunos de los monómeros son idénticos o similares a los que se encuentran en las paredes celulares de las plantas (Sutherland 2005). De hecho, algunos de los EPS bacterianos han servido de sustratos a mezclas enzimáticas que no proceden de fuentes de microorganismos (Sutherland 2001).

Algunos hongos pueden degradar la pared celular de las plantas, mediante la secreción de enzimas. Esta versatilidad hace que mezclas de enzimas comerciales degraden los EPS, por lo que su uso se ha generalizado en varios campos, como la transformación de frutas (McKay 1993) o el tratamiento de aguas residuales (Wesenberg y col. 2003). Esta versatilidad también podría ser utilizada para degradar las matrices de EPS bacterianos, o para prevenir y controlar la formación de biopelículas en el sistema de tuberías de las fábricas de papel. Debido a la heterogeneidad de los EPS puede ser necesaria una mezcla de enzimas para la degradación eficiente de una biopelícula. El uso de una enzima que es biodegradable y tiene una baja toxicidad es aceptable y económicamente atractivo debido a su contribución a la minimización de la utilización de biocidas.

Dosificación de Pectinex Smash®

En el ensayo realizado durante 190 h con Pectinex Smash®, no hubo una variación significativa en el recuento total de bacterias en los cuatro biorreactores. Después de 24 h, la formación de la biopelícula se evidenció por la observación visual de los cupones en el biorreactor sin tratamiento y en el que se adicionó 1 ppm de Pectinex Smash®. En el biorreactor con 10 ppm y 100 ppm de enzima, la biopelícula de los biorreactores se identifica a simple vista a las 48 h. El peso en seco de la materia orgánica depositada sobre los cupones del biorreactor sin tratamiento o con 1 ppm de Pectinex Smash® fue muy similar, lo que indica que una concentración de 1 ppm de Pectinex Smash® no afectó la producción de la biopelícula (Fig. 11).

Cuando la dosis de enzima fue de 10 ppm, se observó un efecto moderado sobre la acumulación de biopelícula que redujo el peso del contenido orgánico en los cupones hasta el 50%. Sin embargo, la adición de una concentración de 100 ppm de Pectinex Smash® dificultó enormemente la producción de la biopelícula. El peso de la formación de biopelículas sobre los cupones fue 5 veces menor con 100 ppm de

Pectinex Smash® que en ausencia de la enzima. Por lo tanto, la eficacia de la utilización de 100 ppm es comparable con la observada en presencia de 1000 ppm de la misma enzima, en los ensayos anteriores.

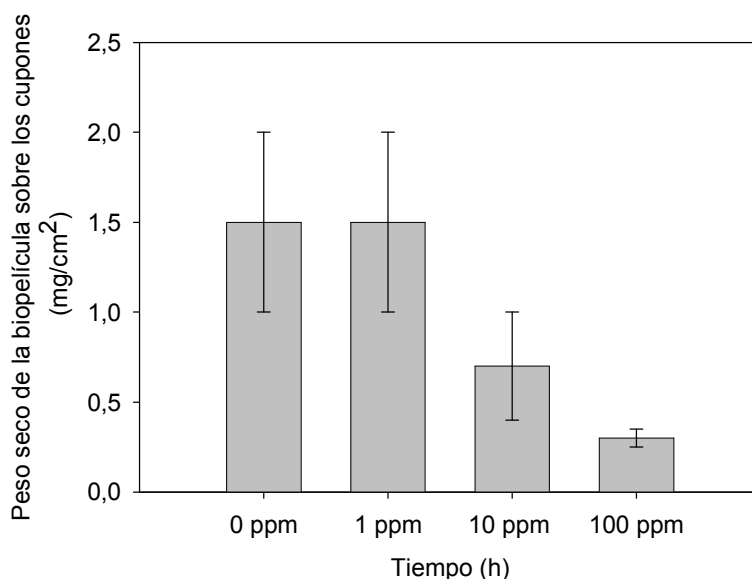


Figura 11.- Efectos de las diferentes dosis de Pectinex Smash®.

4.2.3 Tratamiento con la nueva enzima desarrollada

Los ensayos con colanasa se realizaron sobre las cepas de enterobacterias aisladas de fábricas de Finlandia y España. Los cultivos se separaron de acuerdo a su lugar de origen y se cultivaron de forma mixta.

Las cepas aisladas de la fábrica de Finlandia fueron: *Citrobacter sp.* (E-011941), *Enterobacter sp.* (E-011940, E-011942 y E-011943). Las cepas aisladas de una fábrica de España fueron: *Bacillus megaterium* (E-22115), *Enterobacter cloacae* (E-022114 y E-022119), *Enterobacter aerogenes* (E-22118), *Raoultella planticola* (E-022116) y *Klebsiella pneumoniae* (E-11927).

El efecto de 50 ppm del producto se estimó por la medición de las UFC del medio de cultivo, las UFC sobre la superficie del cupón y la medida de peso seco de los cupones, además de la observación directa de los cupones teñidos en el blanco de calcofluor para análisis cualitativo de las muestras.

La figura 12 muestra los resultados obtenidos. El análisis demuestra que la enzima actuó sobre los dos cultivos mixtos, pero de manera diferente. En el caso de las cepas de Finlandia el tratamiento fue más eficaz como inhibidor de la formación de la biopelícula, mientras que en las cepas aisladas de la fábrica española se observa claramente que, aunque la cantidad de biopelícula en el cupón disminuyó en presencia de colanasa, las UFC/cm² aumentaron significativamente. Este tipo de resultado obedece a la respuesta de estas cepas ante la presencia de un agente extraño, lo que aumenta la adherencia de las bacterias y/o la maduración de la biopelícula (Jensen y col. 2007, Carpentier y Chassaing 2004).

Las imágenes obtenidas dejan ver claramente la diferencia entre los ensayos con y sin tratamiento enzimático (Fig. 13-A y C). Los cupones del cultivo mixto de las cepas de Finlandia tratados con la enzima se ven con menos colonización, a diferencia de los cupones del cultivo mixto con cepas de España, donde se aprecia que no hay zonas verdaderamente libres de microorganismos (Fig. 13-B y D). Las imágenes mostradas corresponden a diferentes zonas de los cupones analizados.

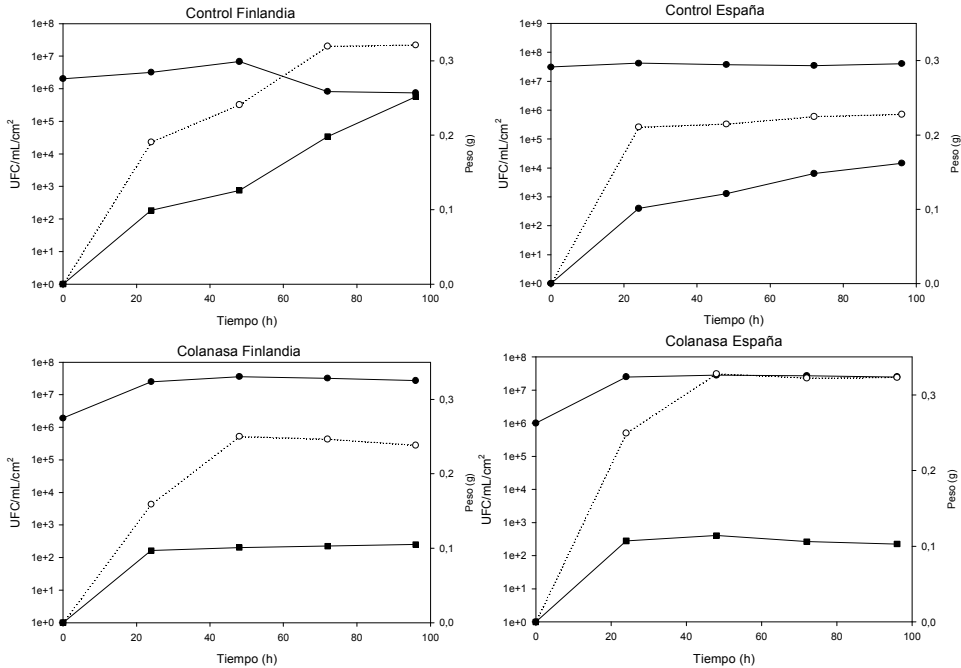


Figura 12.- Efectos colanasa sobre cultivos mixtos. ● UFC/mL, ○ UFC/cm², ■ Peso (g).

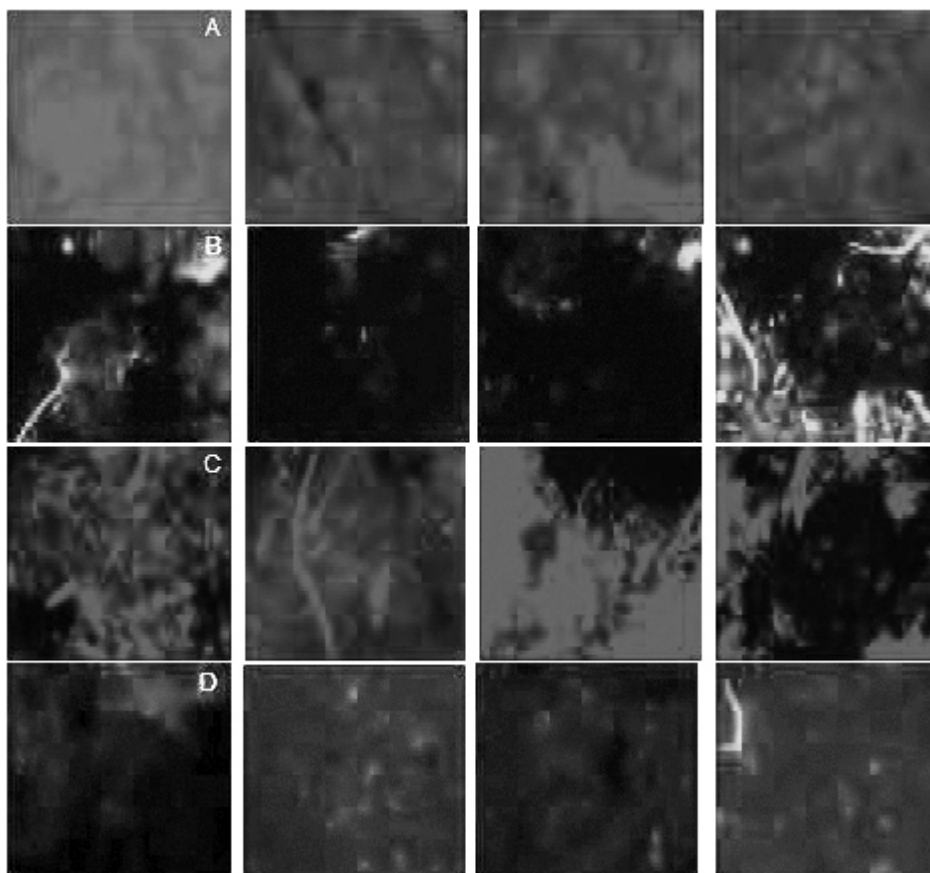


Figura 13 .- Imágenes Microscopía de fluorescencia. A: control cepas Finlandia, B: tratamiento colanasa cepas Finlandia, C: control cepas España y D: tratamiento colanasa cepas España.

4.2.4 Tratamientos con biodispersantes

En esta tesis doctoral, también se estudiaron los efectos de biodispersantes sobre cinco cepas formadoras de biopelículas y productoras de olor con el fin de determinar su modo de acción. Este podría incluir: la pérdida de la biopelícula, promover la penetración de agentes antimicrobianos en el depósito, y la eliminación de biopelículas muertas o de edad avanzada evitando así una rápida recuperación.

Los biodispersantes son compuestos de origen biológico que se originan a partir de carbohidratos, péptidos y polipéptidos y de aceites y grasas. Son productos biodegradables y biocompatibles que contribuyen a la estabilización o dispersión de las biopelículas sin inhibir el crecimiento celular y a la reducción del uso de biocidas. Además pueden ser usados sobre diferentes pastas celulósicas y bajo diferentes condiciones de operación, reduciendo así, el impacto sobre el medio

ambiente. Por otra parte, estos productos pueden reemplazar a los surfactantes petroquímicos existentes en la actualidad.

Para estimar la eficiencia de los cinco biodispersantes, se utilizó el ensayo de microplaca que permite el estudio de los efectos individuales de los productos sobre la formación de la biopelícula y su degradación. Las cepas escogidas para este estudio fueron: *Streptomyces albus* (E-95630), *Bacillus licheniformes* (E-95602), *Acinetobacter baumannii* (E-981142), *Citrobacter freundii* (E-96692) y *Klebsiella oxytoca* (E-95642). Este método permite obtener 8 réplicas de cada concentración probada.

Inhibición de la formación de la biopelícula

El ensayo para determinar el efecto de cada biodispersante sobre la formación de biopelícula, se llevó a cabo con distintas concentraciones que se añadieron a los microorganismos planctónicos, al inicio de la experimentación (apartado 3.4.4). Su efecto se valoró con la medición indirecta de la formación de biopelícula, basado en la medición de la densidad óptica de la tinción de cristal violeta que se absorbió sobre la biopelícula adherida a la superficie de la microplaca. Los resultados de la inhibición se muestran en la figura 14.

La cepa de *Streptomyces albus* no se inhibió por la presencia de los diferentes biodispersantes. Ninguno de ellos pudo detener la formación de la biopelícula. Cuando se empleó el biodispersante A la densidad óptica aumentó considerablemente en comparación con los otros biodispersantes. Aumentó de forma progresiva de acuerdo a la concentración del producto.

La cepa de *Citrobacter freundii* exhibió un aumento significativo en la formación de la biopelícula en presencia de una concentración de 7,1 ppm del biodispersante A. A partir de esta concentración, se observó un descenso progresivo hasta alcanzar los valores del control (0 ppm). Con la adición del biodispersante B, los valores de densidad óptica se mantuvieron constantes y similares a la muestra control hasta una concentración de 35 ppm. Estos valores disminuyeron en relación a la concentración a partir de 68,06 ppm. El dispersante C fue el que tuvo un efecto adverso mayor desde una concentración de 3,6 ppm. Este aumento se estabilizó a dosis inferiores a 24,6 ppm. A partir de esta concentración se observó un aumento progresivo de la formación de la biopelícula asociado a la concentración del biodispersante. Los biodispersantes D y E fueron los únicos que actuaron desde la primera dosis y causaron una mayor inhibición a medida que aumentaba su concentración.

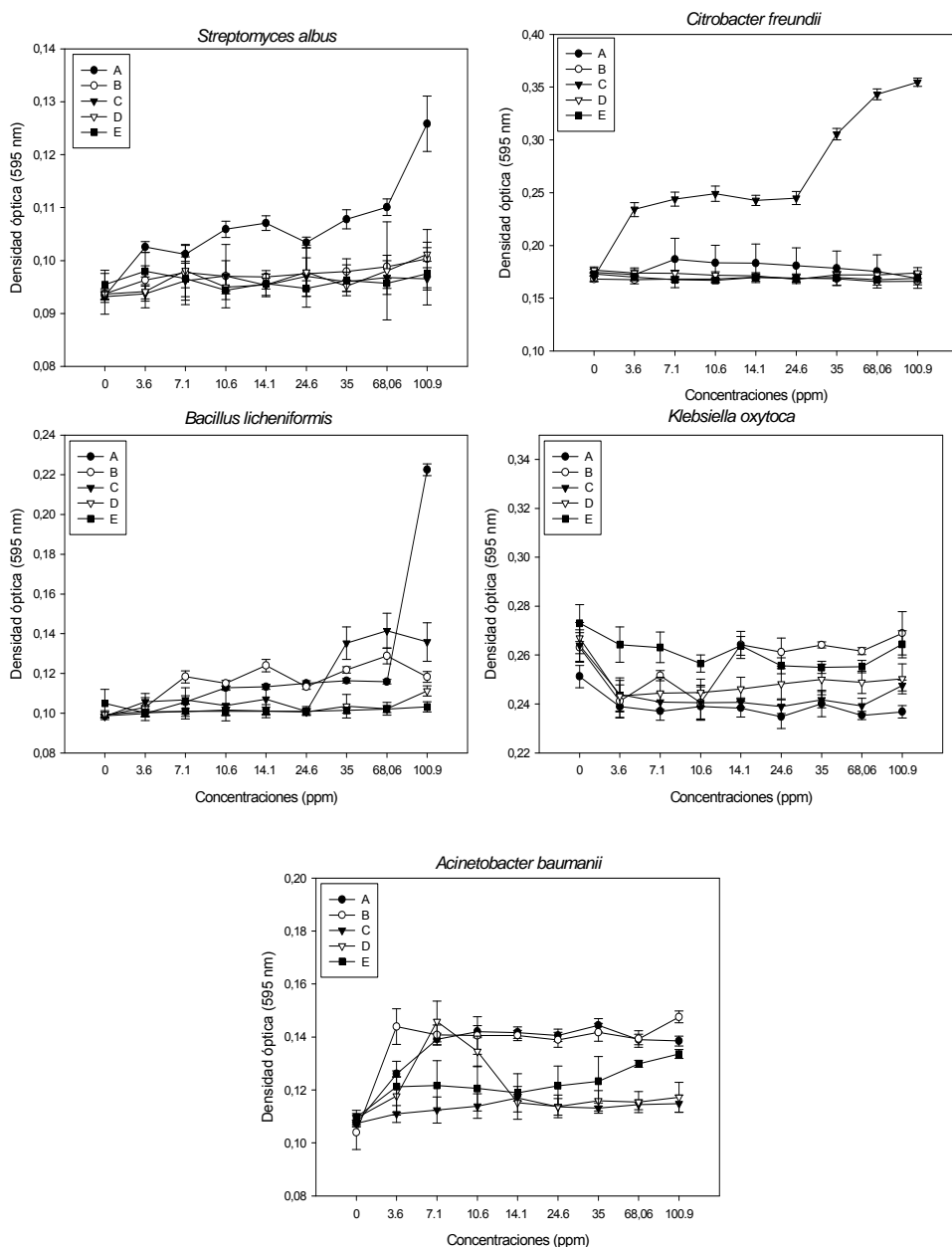


Figura 14.- Efectos de los biodispersantes sobre la inhibición de la formación de la biopelícula.

El *Bacillus licheniformis* presentó un aumento moderado a partir de una dosis de 3.6 ppm de biodispersante A, a excepción del resultado observado a la concentración de 100,9 ppm, que muestra un aumento bastante importante de la formación de la biopelícula. Con el biodispersante B el aumento fue progresivo y moderado, asociado a las

concentraciones. El biodispersante C también causó aumento moderado hasta una concentración de 24,6 ppm.

A partir de esta concentración la formación de biopelícula aumentó drásticamente. En el caso de los biodispersantes D y E inhibieron la formación de biopelícula desde la primera concentración, por debajo de los valores calculados para la muestra control.

La formación de biopelícula por la cepa de *Klebsiella oxytoca* se inhibió con todos los biodispersantes. El biodispersante E la inhibió de forma moderada, los valores de densidad óptica se mantuvieron constantes con todas las concentraciones. El biodispersante B inhibió la formación de la biopelícula hasta una concentración de 10,6 ppm, luego se observó un aumento que se mantuvo constante y que no superó los valores de la muestra control. Los biodispersantes A, C y D inhibieron de forma importante la formación de la biopelícula. El descenso se asoció a la concentración de biodispersante que se añadió.

La cepa de *Acinetobacter baumannii* no se inhibió con ninguno de los biodispersantes. Los biodispersantes A, B y D aumentaron la formación de biopelícula entre 3,6 ppm y 7,1 ppm. Los valores se mantuvieron constantes con las demás dosis, a excepción del caso del biodispersante D que en la concentración de 10,6 ppm, causó un descenso hasta alcanzar los valores de la muestra control. Los biodispersantes C y E permitieron la formación de biopelícula de forma moderada. Esta formación se asoció con la concentración de biodispersante.

Degradación de la biopelícula

El ensayo para el estudio de la degradación de la biopelícula se llevó a cabo en paralelo con el anterior. La diferencia radica en que los biodispersantes se añadieron después de 24 h de crecimiento de los microorganismos. Al igual que en el ensayo anterior, los resultados se basaron en la medida de densidad óptica del cristal violeta. Los resultados de la degradación se muestran en la figura 15.

La cepa de *Streptomyces albus*, no se vio afectada por ningún dispersante. En todos los tratamientos se observó que la biopelícula fue en aumento y ninguno de los biodispersantes pudo degradar la biopelícula por debajo de los valores de la muestra control.

Sólo los biodispersantes A y B lograron un descenso de la densidad óptica a partir de las concentraciones de 24,6 ppm y 10,6 ppm, respectivamente, pero no lograron valores inferiores a la muestra control.

Se observa que la biopelícula formada por la cepa del *Citrobacter freundii* se vio afectada por los biodispersantes D y E, desde la primera dosis. La degradación de la biopelícula dependió de la dosis empleada,

a mayor dosis mayor degradación. Los dispersantes A, B y C no degradaron la biopelícula.

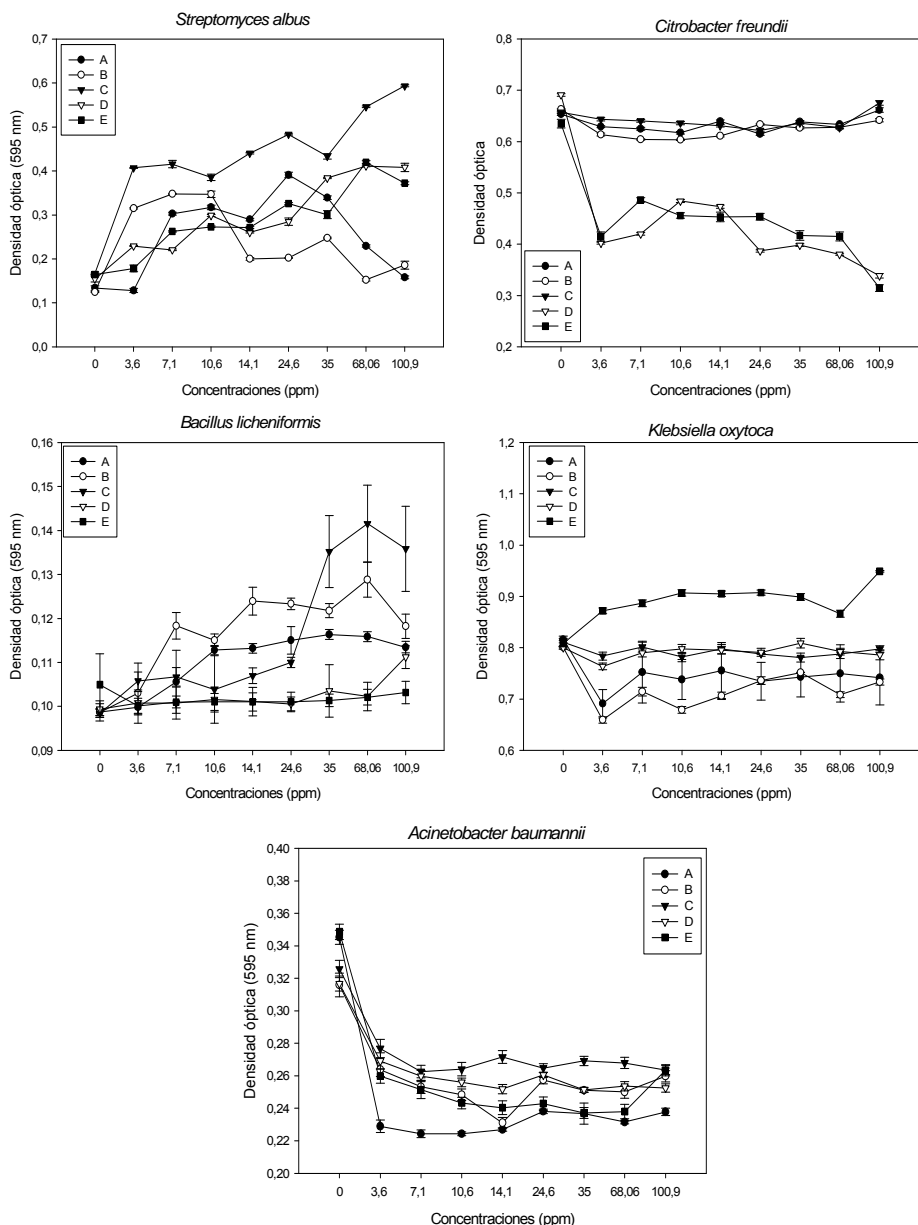


Figura 15.- Efectos de los biodispersantes sobre la degradación de la biopelícula.

La adición de los biodispersantes A, B y C a la biopelícula formada por *Bacillus licheniformes* favoreció la formación de ésta, como muestran los valores de densidad óptica, que aumentaron con la dosis de

biodispersante, alcanzando valores máximos a una concentración de 68,06 ppm para disminuir a concentraciones mayores, pero nunca por debajo de los valores de la muestra control. Los biodispersantes D y E mantuvieron valores similares al del control.

La biopelícula de *Klebsiella oxytoca* se degradó con todos los biodispersantes a excepción del biodispersante E. Los biodispersantes A y B fueron más eficaces en la degradación que los biodispersantes C y D. Los resultados obtenidos con A y B muestran la existencia de una dosis óptima (3,6 ppm) a partir de la cual el efecto del biodispersante sobre la biopelícula disminuye. Por otra parte, la degradación se mantuvo constante con todas las concentraciones de C y D. No se observó un descenso de la densidad óptica asociado a la concentración, cuando ésta superó el valor óptimo.

Por último, la biopelícula de *Acinetobacter baumannii* se degradó con todos los biodispersantes usados en el estudio. El biodispersante A fue el más eficaz, seguido por los biodispersantes E, B, D y C. Cuando se empleó el biodispersante A, el efecto no varió con la cantidad de producto añadido, en el intervalo de dosis de 3,6 ppm a 24,6 ppm. Concentraciones superiores a ésta tuvieron un efecto menor sobre la biopelícula.

En resumen, los efectos de los cinco biodispersantes se estudiaron por separado, mediante la realización de dos tipos de experimentos, uno para la inhibición de la formación de biopelícula y otro para la reducción de espesor de la biopelícula mediante su degradación. Se observó que cada producto afecta a las biopelículas de las diferentes cepas de manera diferente. Mientras que algunos inhiben o retardan la formación de biopelículas, otros reducen el espesor de las mismas una vez formadas. Por ejemplo, los biodispersantes A y C inhiben la formación de biopelícula de una de las cepas estudiadas; los biodispersantes B y D de dos de las cepas; el biodispersante E inhibió la formación de la biopelícula de tres de las cepas. Sin embargo, los resultados de los ensayos de degradación muestran que todos los biodispersantes lograron dispersar la biopelículas de por lo menos tres de las cepas. Las cepas que mostraron más resistencia frente a los tratamientos aplicados fueron *Streptomyces albus* (no sufrió inhibición ni degradación con ninguno de los biodispersantes estudiados) y el *Bacillus licheniformes* (sobre el que sólo actuó el biodispersante E). Los biodispersantes mostraron baja o nula toxicidad.

Los resultados obtenidos con los cinco biodispersantes estudiados han demostrado que muchos biodispersantes disponibles en el mercado, en ausencia de un microbicida, tienen poca o ninguna capacidad para prevenir o eliminar una biopelícula existente. La mayoría de las aplicaciones de los biodispersantes comerciales incluyen el uso de un microbicida. En el caso del uso de dispersantes, es necesario evaluar la acción de los biodispersantes y conocer su composición química, debido

a que algunos problemas han sido asociados con el uso de productos orgánicos naturales ya que pueden ser usados como alimento por parte de los microorganismos, o en otras ocasiones, las concentraciones efectivas necesarias son altas. Por ejemplo, los lignosulfonatos pueden mejorar el crecimiento de microorganismos en determinadas circunstancias, debido a la presencia de azúcares que pueden ser utilizados como nutrientes por los microorganismos (Cardoso 1992). Akihiro y col. (2006) hacen referencia a que se produjo el crecimiento bacteriano en el medio ambiente donde los dispersantes eran la única fuente de carbono.

Generalmente, las biopelículas muestran una mayor resistencia a los biodispersantes en comparación con sus formas planctónicas (Bardouniotis y col. 2003). Este no siempre es el caso, sugiriendo que cada microorganismo productor de biopelícula se debe considerar por sí mismo, en cuanto a su susceptibilidad a los antibióticos, biocidas o agentes dispersantes. Existen diversas hipótesis con respecto a las diferencias entre las respuestas de la biopelícula y de las bacterias planctónicas ante los tratamientos de control y por tanto, ésta sigue siendo un área de investigación que requiere un examen más detenido. Está claro que la susceptibilidad de las poblaciones planctónicas a los agentes de control no necesariamente implica que el tratamiento sea eficaz una vez que la biopelícula se ha establecido.

En consecuencia, con el fin de probar y comparar la eficacia de productos para el control de la biopelícula, es vital que las pruebas se lleven a cabo bajo condiciones idénticas ya que la calidad de las biopelículas se ven afectadas por las condiciones en que se desarrollan. Hay cuatro grupos de condiciones variables que están involucradas: la concentración de microorganismos, la disponibilidad y calidad de nutrientes, las condiciones externas como la temperatura y el pH, y la superficie donde se forma la biopelícula. Por lo tanto, en cualquier programa de prueba es de vital importancia que estas variables estén adecuadamente controladas.

Se recomienda emplear monocultivos de microorganismos para el estudio de la eficacia de los tratamientos de control, ya que se ha encontrado que es extremadamente difícil mantener la consistencia de los sistemas mixtos de especies durante un período de tiempo apropiado que permita realizar pruebas significativas (Bott 2007). Por otra parte, sería deseable proporcionar un método de eliminación de biopelículas en las superficies sumergidas en agua usando un biodispersante que sea eficaz tanto en solitario como combinado con un biocida.

La investigación corrobora que los biocidas matan a los microorganismos, las enzimas digieren la matriz de EPS y los dispersantes imponen una carga eléctrica, ya sea en el sustrato o en las células individuales, para reducir la posibilidad de adhesión, reduciendo así el potencial para el desarrollo de las biopelículas sobre las

superficies del equipo (Blanco 2003, Bott 2007). Lo cual permite validar las metodologías experimentales utilizadas en distintos estudios de esta tesis doctoral.

4.3 Video Microscopía Continua: nueva técnica de seguimiento de la formación de la biopelícula

El estudio de la eficacia de la técnica de video microscopía continua como herramienta de seguimiento de la formación de la biopelícula se realizó en dos fases. La primera de ellas se enfocó en observar la capacidad de la técnica para detectar la formación de la biopelícula. De acuerdo a los excelentes resultados obtenidos con el cultivo puro, se decidió, en la segunda fase de la experimentación, probar la aplicación de la técnica sobre cultivos mixtos procedentes de aguas de proceso. Además, se estudió el efecto de diferentes tratamientos enzimáticos para validar la técnica desarrollada.

4.3.1 Ensayos con cultivos puros

El primer conjunto de experimentos, se concibió para evaluar si la técnica PVM es adecuada para monitorizar la formación de biopelícula y para seleccionar el mejor parámetro estadístico de la distribución de longitudes de cuerda para representar el proceso de formación de biopelículas, ya que un monocultivo es más fácil de controlar y más predecible que la flora mixta natural. Con este propósito, se llevó a cabo un experimento utilizando como cultivo puro *Enterobacter cloacae* (E-22114). La cepa se cultivó en el medio mencionado anteriormente (apartado 3.2). Durante el experimento se tomaron imágenes cada 4 h con la sonda de PVM para monitorizar la formación de biopelícula sobre la ventana de la sonda en tiempo real. La figura 16 muestra algunas de las imágenes obtenidas.

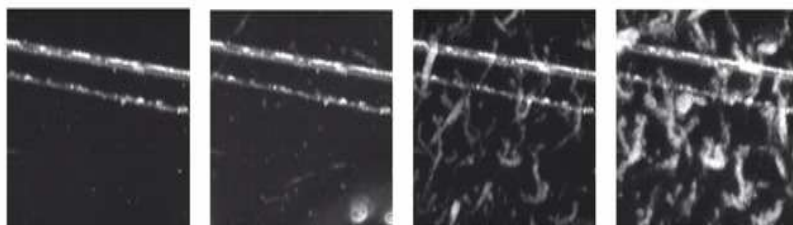


Figura 16.- Imágenes obtenidas con el PVM durante los experimentos con cultivo puro.

Se estudiaron las distribuciones de longitudes de cuerda obtenidas a partir del análisis de la secuencia de imágenes y se calcularon diferentes estadísticos (por ejemplo, el número total de cuentas, el tamaño medio de cuerda, etc.) para identificar los parámetros estadísticos cuya evolución refleje adecuadamente y de manera sencilla la formación de la

biopelícula. Así, se encontró que el crecimiento de la biopelícula podía monitorizarse de forma indirecta mediante el análisis de imagen con la media cuadrática ponderada de la distribución \bar{C} .

La media cuadrática ponderada \bar{C} se calcula a partir de cada distribución de tamaño de cuerda con la ecuación (7).

$$\bar{C} = \frac{\sum_{i=1}^{90} n_i M_i^3}{\sum_{i=1}^{90} n_i M_i^2} \quad [7]$$

El intervalo de medición del PVM es de 5 a 2000 μm . Este espacio se divide en 90 intervalos para obtener el histograma. "i" representa el número de intervalo (1,2, ..., 90), " n_i " es el número de cuentas detectados cuyo tamaño está entre los límites del intervalo i , y M_i es el punto medio del intervalo i (μm). El valor de \bar{C} obtenido al inicio de la prueba corresponde a los surcos que se realizaron sobre la lente para favorecer la adhesión.

Este valor se restó de los valores de \bar{C} asociados con la formación de la biopelícula. La variable que representa la formación de la biopelícula es el incremento del valor de \bar{C} durante el experimento.

La figura 17 muestra que la evolución de la media cuadrática ponderada del tamaño de cuerda se puede utilizar como una medida indirecta de la formación de biopelículas. Esto concuerda con el significado de dicho parámetro estadístico, ya que el aumento de ésta es una función del incremento en el porcentaje de área de la ventana cubierta por los depósitos y es más sensible a los cambios en los tamaños de cuerda grandes que otros estadísticos, lo que reduce el ruido debido a la presencia de burbujas.

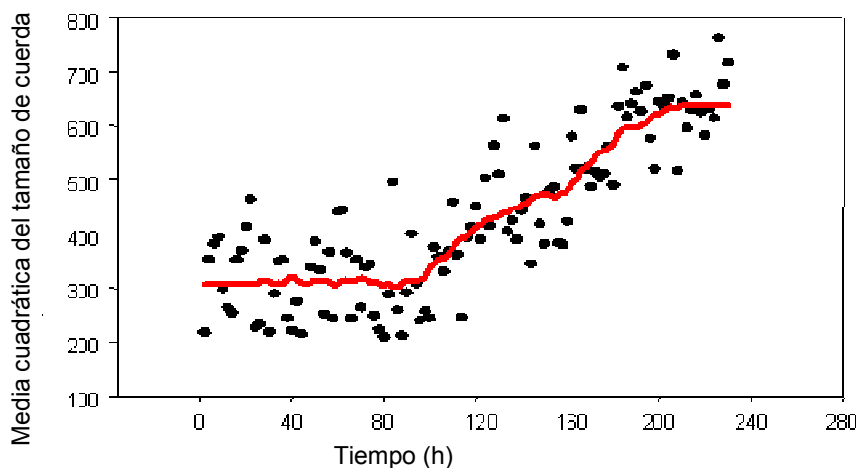


Figura 17.- Evolución de la media cuadrática ponderada del tamaño de cuerda.

La aparición de una zona sin crecimiento se corresponde al periodo de adaptación de las bacterias al medio, durante el cual la adherencia es mínima. Este periodo de inducción es seguido por un crecimiento exponencial, que se detecta entre las 120 y las 192 h. Por último, los valores de \bar{C} se mantuvieron constantes entre las 192 y las 240 h, lo que indica que se alcanzó la maduración de la biopelícula.

El análisis de las imágenes obtenidas corrobora que la formación de biopelícula en el medio de cultivo se puede medir con la sonda del PVM, y que la evolución de la media cuadrática ponderada representa el crecimiento de biopelículas con éxito.

4.3.2 Ensayos con comunidades mixtas

Una vez validado el método desarrollado, éste se utilizó para estudiar los efectos de tres tratamientos enzimáticos (Pectinex Smash®, Viscozyme L® y Novozyme 863®), con una dosis de 1000 ppm, en la formación de biopelícula con la flora natural presente en las aguas de proceso de una fábrica de papel 100% reciclado. Estos productos se seleccionaron por ser los más efectivos en el control de la formación de la biopelícula, como se ha demostrado en el apartado 4.2.2. Las figuras 18, 19 y 20 muestran los resultados de la acumulación de biopelícula en la superficie de los cupones (UFC/cm²), el peso seco (mg/cm²) y los resultados obtenidos con el PVM, representados como la media cuadrática del tamaño de cuerda. La población bacteriana también se midió mediante el recuento en placa de bacterias aerobias presentes en las aguas (UFC/mL). Durante los experimentos, el recuento total de bacterias en el medio de cultivo no varió significativamente, ya que siempre estuvo entre las 10⁷ y 10⁸ UFC/mL.

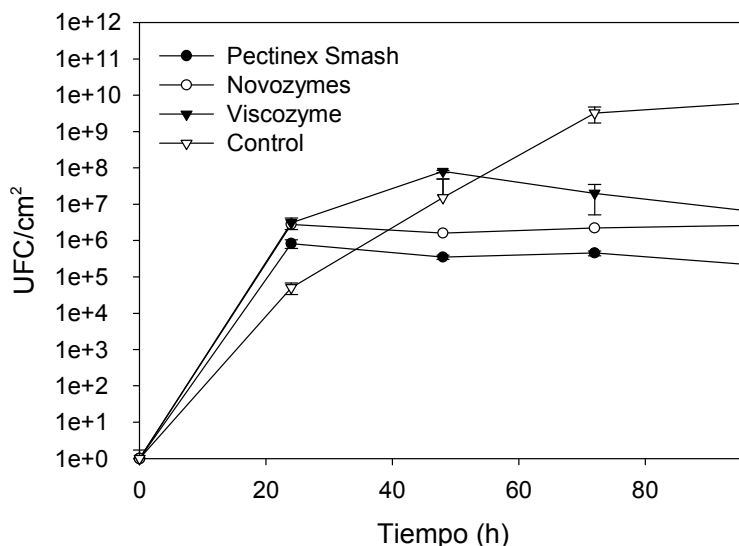


Figura 18.- Efectos de los tratamientos enzimáticos sobre microorganismos adheridos a la superficie.

Los valores finales de peso seco y de UFC/cm² (96 h) en los cupones extraídos de las muestras tratadas, fueron significativamente menores que los valores de los parámetros obtenidos a partir de los cupones extraídos de la muestra de control (Fig. 18 y 19). Esto sugiere que los tratamientos ensayados inhiben la formación de biopelícula. Teniendo esto en cuenta, de alguna manera es sorprendente que el tratamiento enzimático de las aguas de proceso aumentase el número de UFC/cm² medido a las 24 h con respecto a la muestra de control (Fig. 18).

Sin embargo, el peso seco de biomasa en los cupones extraídos a las 24 h fue muy similar en los cuatro casos (Fig. 19). Esto indica que el tratamiento no aumentó la masa de biopelícula, pero aumentó la adherencia de las células a los cupones en las primeras etapas. Este efecto concuerda con las observaciones hechas por otros autores que han demostrado que la presencia de sales, desinfectantes y otros compuestos, o de otras bacterias puede aumentar la adherencia de bacterias e incluso fomentar la maduración temprana de la biopelícula (Jensen y col. 2007, Carpentier y Chassaing 2004).

A las 48 h de ensayo, las diferencias entre los valores de UFC/ cm² disminuyeron (Fig. 18), pero el peso seco del cupón extraído a las 48 h en el ensayo control y en el ensayo con Novozyme 863® fue significativamente más alto que en los otros dos ensayos (Fig. 19). Las diferencias entre los ensayos aumentaron con el paso del tiempo debido a la cantidad de biomasa seca en los cupones extraídos.

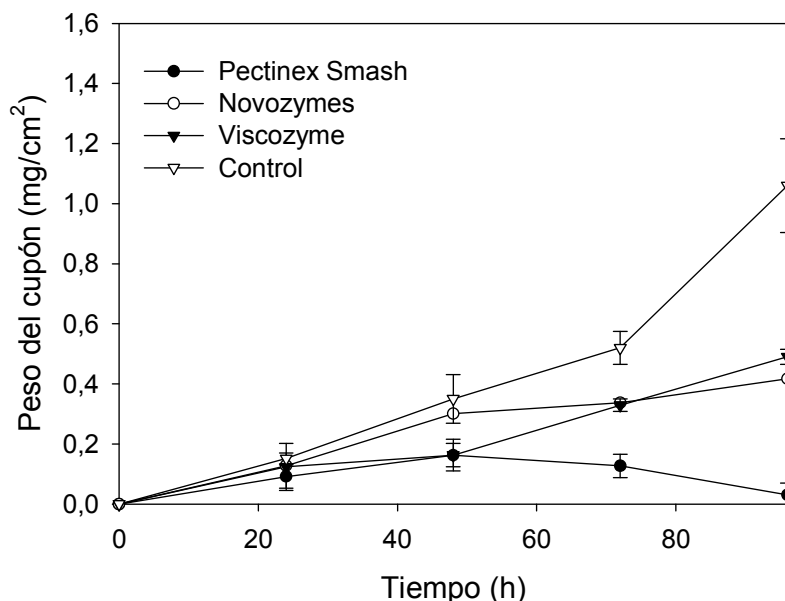


Figura 19.- Efectos de los tratamientos enzimáticos sobre peso seco de los cupones.

En el ensayo de control el peso del cupón aumentó continuamente, mientras que en presencia de Novozyme® el aumento se observó sólo hasta las 48 h, luego el peso de los cupones permaneció constante. En el caso de Pectinex Smash® se observó un aumento del peso del cupón hasta las 48 h, luego la cantidad de biopelícula disminuyó constantemente (Fig. 19). Estos resultados concuerdan con los obtenidos del recuento de UFC/cm², que aumento en la muestra de control, mientras que se mantuvo constante en las muestras con Pectinex Smash® y Novozyme 863® entre las 48 y 96 h. Por lo tanto, estos dos tratamientos no previenen la adherencia bacteriana, pero sí inhiben la producción de EPS que confiere protección a las bacterias, y son usados por otros microorganismos como punto de anclaje para formar la biopelícula. Los tratamientos estudiados no presentaron acción biocida impidiendo que se desencadenen mecanismos de resistencia. Además, estos tratamientos inhiben la formación de EPS de dos formas: por limitación de las bacterias adheridas a la superficie o por la inhibición de la formación de la biopelícula, especialmente en el caso del Pectinex Smash®, aunque su efecto no se evidenció en tiempos cortos.

El tratamiento con Viscozyme L® demostró ser más efectivo y más rápido que Novozyme 863® (Fig. 19). Sin embargo, después de 72 h la cantidad de biomasa sobre el cupón aumentó hasta alcanzar valores

más altos que con los otros dos tratamientos a las 96 h. Los valores de UFC/cm² obtenidos con Viscozyme L® fueron más bajos con los otros tratamientos, aunque superiores a los de la muestra control a las 24 h de ensayo (Fig. 18), pero con el paso del tiempo esta diferencia no se mantuvo. Finalmente, a partir de las 48h el peso de la biomasa y el número de UFC/ cm² aumentaron con una tendencia similar a la del ensayo de control aunque con valores más bajos, lo que indica que durante las primeras 48 h, el tratamiento con Viscozyme L® afectó a la producción de EPS y a la estabilidad en la adherencia de bacterias.

Al comparar los resultados obtenidos mediante el PVM con las técnicas convencionales usadas a escala industrial (peso seco y colonización del cupón), se debe tener en cuenta que el primer método es una técnica de medida en línea y no requiere la manipulación de la muestra durante la experimentación, evitando así pérdidas de parte de la biopelícula, especialmente cuando está débilmente adherida a la superficie, lo cual podría estar ocasionado por los tratamientos enzimáticos.

La figura 20 muestra la evolución de \bar{C} , durante los ensayos realizados con las aguas de proceso. En el caso de la muestra control, \bar{C} aumentó a partir de la hora 20, alcanzando un máximo a las 80 h. Las imágenes en la figura 21 muestran la formación de la biopelícula. En el ensayo de control, por lo menos se pueden observar dos colonias a las 36 h, que luego aumentaron de tamaño. Las colonias primero se formaron sobre los surcos grabados en la lente, como era de esperar, ya que este tipo de bacterias se adhieren mejor sobre superficies rugosas. Luego, el tamaño de las colonias aumentó y se pudieron detectar más colonias sobre la lente lo que se refleja en un aumento en la \bar{C} (Fig. 21), coincidiendo con los datos obtenidos en el recuento de UFC/cm² y en la medida de peso seco sobre los cupones (Fig. 19 y 20).

En el tratamiento con el Pectinex Smash®, la media cuadrática disminuye ligeramente desde el inicio del ensayo (Fig. 20). Las imágenes muestran que este decaimiento se ocasionó por la presencia de burbujas que desaparecieron a lo largo de la experimentación (Fig. 21). Las burbujas se captaron por el equipo como partículas debido a su brillo y a su tamaño en particular.

La figura 22 muestra con más detalle una de estas burbujas. Los resultados obtenidos con el PVM demuestran que el tratamiento con Pectinex Smash® es el más efectivo para prevenir la formación de biopelícula como se demostró en el apartado 4.2.2..

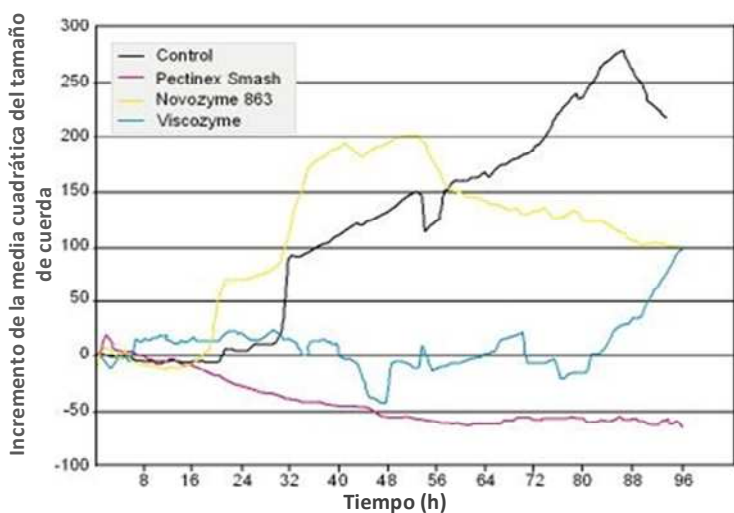


Figura 20.- Efectos de los tratamientos enzimáticos sobre la variación de la media cuadrática del tamaño de cuerda.

Cuando se analizó la colonización de los cupones, se observó que el peso seco de la biomasa sobre los cupones fue el más bajo de los tres tratamientos aplicados y que la inhibición de la formación de la biopelícula fue efectiva. Lo mismo se concluye para las imágenes tomadas con el PVM con algunas interferencias ocasionadas por la presencia de burbujas en las aguas de proceso al inicio de la experimentación.

Cuando se analizó el tratamiento con Novozyme 863®, la media cuadrática permaneció constante durante las primeras 16 h del ensayo, pero con el paso del tiempo este valor aumentó hasta alcanzar un valor máximo sobre la hora 50 que finalmente disminuyó. Las imágenes obtenidas en este caso (Fig. 21b) muestran que el inicio de la colonización se produjo donde se encontraban los surcos de la lente y que los microorganismos generaron EPS que se unieron de manera débil a la lente desprendiéndose sobre la hora 50. Esto explica la variación de la media cuadrática del tamaño de cuerda. La figura 18 muestra que con este tratamiento se alcanzó un valor máximo de UFC/cm² a las 24 h, con un ligero descenso después, lo que indica que la colonia creció durante las primeras 24 h.

Las diferencias entre este resultado y los obtenidos con el PVM radican en la naturaleza de las superficies usadas en el estudio, ya que la lente es una superficie de zafiro pulido mientras que el cupón del sistema es de PVC, con más rugosidad en la superficie y, por lo tanto, permite una mayor facilidad de anclaje.

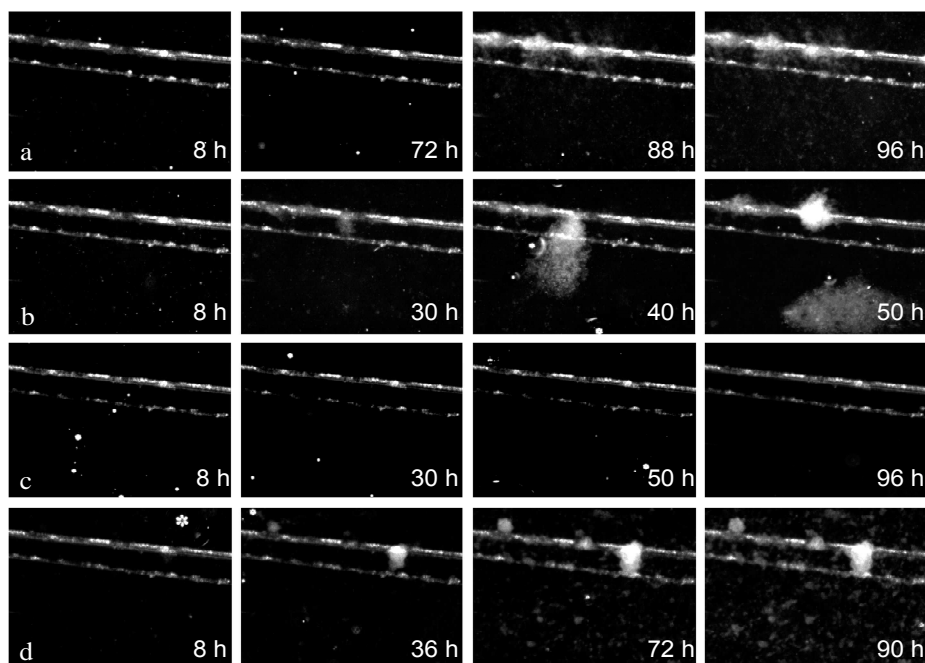


Figura 21.- Imágenes obtenidas con el PVM durante los ensayos con la flora natural de las aguas de proceso: (a) Viscozyme®, (b) Novozyme 863®, (c) Pectinex Smash®, y (d) muestra control.

Por lo tanto, el máximo valor de la media cuadrática se alcanzó a las 50 h en lugar de a las 24 h en el cupón. Además, como se puede observar en la figura 21, parte del material que formaba la biopelícula se desprendió a las 50 h, hecho que no se pudo observar en los análisis realizados sobre los cupones extraídos a las 48, 72 y 96 h, debido a que para el análisis de los cupones se requiere la apertura de la cámara y la manipulación del cupón dentro del medio líquido, lo que puede ocasionar una pérdida de biomasa especialmente cuando su adherencia es débil. Estos resultados muestran la importancia del uso de herramientas de seguimiento que no requieran la manipulación directa de las muestras, como es el caso del PVM.

Los resultados obtenidos con el tratamiento con Viscozyme L® muestran que el aumento en el valor de la media cuadrática se retrasó hasta las 80 h. Después, este valor aumentó hasta el final del experimento. Los valores de las UFC/cm² obtenidos después de 48 h fueron menores que los de la muestra de control, pero se observó una pequeña disminución en la hora 96, probablemente debido a la pérdida de las células durante la manipulación de los cupones.

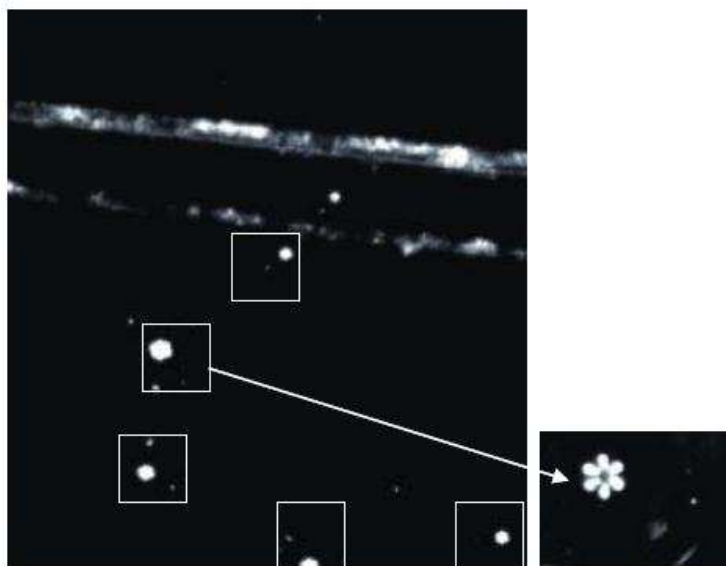


Figura 22.- Identificación de burbujas. El tamaño es el resultado de la reflexión de seis lámparas de la sonda en la superficie de la burbuja.

El peso seco de los cupones muestra una tendencia similar a la del experimento de control, pero con valores más bajos y menor pendiente de la curva. El aumento de la pendiente no se observó hasta que el cupón correspondiente a las 72 h se extrajo. En las imágenes tomadas con el PVM este aumento se observó a las 80 h (Fig. 21) al igual que en la evolución de la media cuadrática del tamaño de cuerda (Fig. 20). Esta diferencia, como ya se ha indicado, se debe a la distinta naturaleza de las superficies y no es una diferencia en la tendencia, sino sólo una diferencia en la fijación de los microorganismos a la superficie.

La metodología desarrollada basada en la toma de imágenes de la biopelícula sobre la lente de la sonda puede ser una poderosa herramienta para: (1) hacer el seguimiento de la formación de biopelícula; (2) caracterizar los efectos de los productos de control sobre la biopelícula; y (3) seleccionar el tratamiento de control más apropiado. Los resultados obtenidos con la sonda del PVM son más precisos que los obtenidos con técnicas convencionales basadas en el peso seco, ya que no requiere la manipulación de las muestras.

4.4 Estudio de la viabilidad celular sobre bacterias formadoras de biopelícula por citometría de flujo. Modelos cinéticos

4.4.1 Densidad óptica frente a Citometría de flujo

Para estudiar la viabilidad celular de los microorganismos considerados más problemáticos, es imprescindible el uso de técnicas

rápidas que permitan conocer su comportamiento bajo condiciones normales.

En esta tesis doctoral se utilizó la turbidez, medida como densidad óptica (DO), y la citometría de flujo (CF) para el control del crecimiento celular de dos cepas, aisladas de la industria papelera y formadoras de biopelículas, en el medio VTT descrito anteriormente (apartado 3.2). Los microorganismos estudiados fueron: *Brevundimona vesicularis* (E-981024) y el *Bacillus megaterium* (E-22115). El análisis de la concentración de biomasa total (células presentes en el medio) en cada tiempo de muestreo se obtuvo a través de mediciones de DO y CF por triplicado (Fig. 23). Cada cepa se controló hasta que alcanzó la fase estacionaria.

Los resultados obtenidos de la biomasa total mediante las dos técnicas de medida (DO y CF) cuando se estudiaron las cepas E-981024 y E-22115 muestran una tendencia similar de crecimiento. Si bien el comportamiento mostrado por las dos cepas fue significativamente diferente, por lo que la concentración de biomasa final alcanzada también fue diferente.

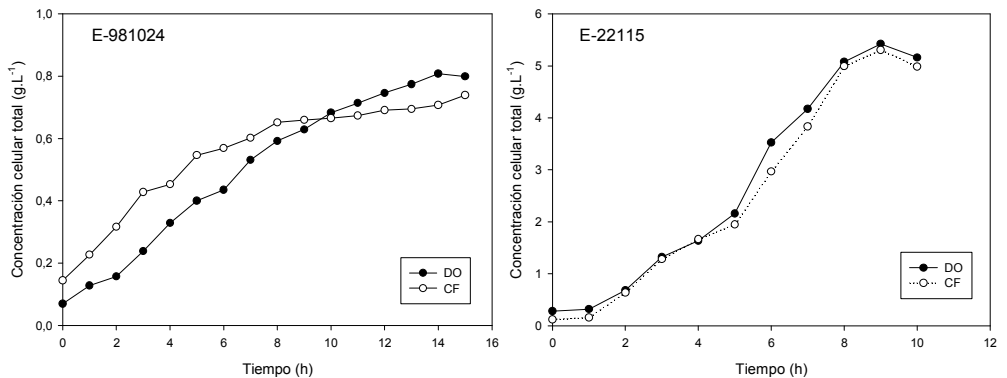


Figura 23.- Concentración de biomasa total (g/L).

La cepa E-981024 no requiere un largo periodo de adaptación al medio de cultivo ya que su fase de crecimiento se inicia desde la primera hora de cultivo. La pendiente de la curva de crecimiento se mantuvo constante durante 6-8 h. La velocidad de crecimiento disminuyó ligeramente a partir de las 8 h de cultivo, sin llegar a una fase estacionaria propiamente dicha. En el caso de la cepa E-22115 la fase de crecimiento se inicia a las 2 h, siendo su evolución más rápida que en el caso de la cepa de E-981024, alcanzando una concentración máxima en torno a las 9 h.

Al comparar los resultados de la CF con la medición de DO para cada organismo, es evidente que la biomasa total es una medida de la concentración total de células. Los valores finales de la concentración de

biomasa alcanzada al final de los experimentos se resumen en la tabla 10.

Tabla 10.- Comparación de la biomasa total obtenida con las dos técnicas.

	Citometría de Flujo (g/L)	Densidad Óptica (g/L)
E-981024	0,77±0,012	0,68±0,010
E-22115	5,16± 0,026	4,98±0,017

En general, la tendencia de crecimiento de las dos cepas obtenida con ambas técnicas fue similar, pero las concentraciones bacterianas (g.L^{-1}) determinadas por la CF fueron ligeramente mayores y similares a los resultados obtenidos por Herrero y col. (2006) en su estudio sobre estados fisiológicos de los microorganismos.

La medición de la turbidez del medio de cultivo no distingue entre células vivas y muertas ya que ambas dispersan la luz por lo que ambas contribuyen a la turbidez del medio. Por el contrario, la viabilidad celular obtenida por CF permite conocer la situación de la biomasa formada durante el crecimiento bacteriano. Además, las mediciones de turbidez no pueden diferenciar subpoblaciones o discriminar entre microorganismos y desechos (Quiros y col. 2007, Hammes y col. 2008, Díaz y col. 2010, Foladori y col. 2010), datos relevantes a la hora de controlar los microorganismos problemáticos en el proceso industrial (Olivier 2005). Por lo tanto, el empleo de CF proporciona mucha más información que la medida de turbidez del medio. Conocer el comportamiento de los microorganismos sería útil en la aplicación de los programas de control antimicrobiológico o para la mejora de bioprocesos (Quirós y col. 2007, Labas y col. 2008). Utilizando la técnica de CF, junto con marcadores fluorescentes se puede llevar a cabo la diferenciación de células más allá de la viabilidad celular.

4.4.2 Caracterización de estados fisiológicos por citometría de flujo

Las medidas multiparamétricas con CF revelan la presencia de los estados fisiológicos intermedios entre la vida y la muerte celular, mostrando la heterogeneidad inherente de las poblaciones microbianas. Las células se pueden clasificar de acuerdo con algunas de las funciones metabólicas activas o con la integridad de las estructuras celulares.

Durante este estudio, se consideró que las células que tienen membranas intactas son células vivas y se marcan únicamente con NT,

las células dañadas presentan doble marcaje (IP+NT) y las células muertas se marcan sólo con IP.

Los resultados del análisis de la cepa E-981024 (Fig. 24) mostraron que, al inicio del experimento, las concentraciones de células dañadas y muertas fueron de $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ y $0,02 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, en relación a la biomasa total que corresponde a la suma de todas las poblaciones.

La concentración de células dañadas aumentó durante las tres primeras horas hasta alcanzar una concentración de $0,13 \text{ g.L}^{-1}$, y se mantuvo durante un intervalo de tiempo corto, luego esta cantidad se redujo a las 10 h, donde se mantuvo más o menos en $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ con respecto a la biomasa total.

En el caso de las células muertas se observó un aumento desde las 4 hasta 11 h, alcanzando una concentración de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ con respecto a la biomasa total. Los valores finales para las dos poblaciones se mantuvieron hasta las 15 h de crecimiento.

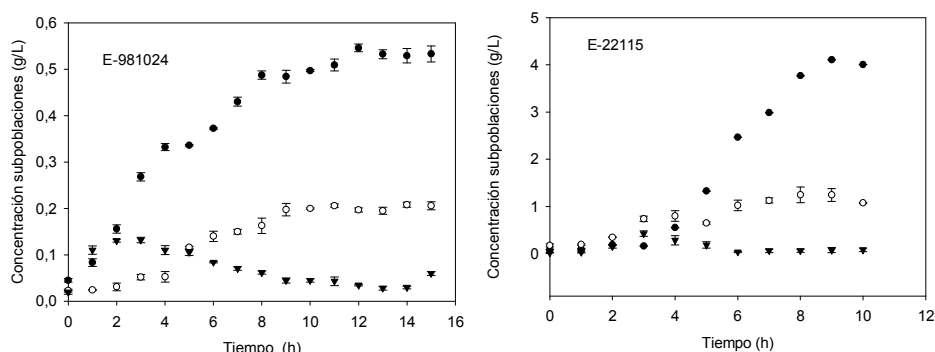


Figura 24.- Resultados obtenidos por citometría de flujo para ambas cepas. Células vivas (●), células muertas (○) y células dañadas (▼).

Por otro lado, la cepa E-22115 tuvo una concentración inicial de $0,018 \text{ g.L}^{-1}$ y $0,17 \text{ g.L}^{-1}$ de células dañadas y muertas, respectivamente. Las células dañadas aumentaron entre las dos horas y las tres horas, alcanzando una concentración de $0,32 \text{ g.L}^{-1}$. La población luego disminuyó de manera exponencial hasta las 8 h, alcanzando valores $0,14 \text{ g.L}^{-1}$ que se mantuvieron constantes hasta las 10 h de seguimiento. Las células muertas aumentaron a las 2 h de cultivo, alcanzando, 43 g.L^{-1} que se mantuvo constante hasta las 10 h de cultivo.

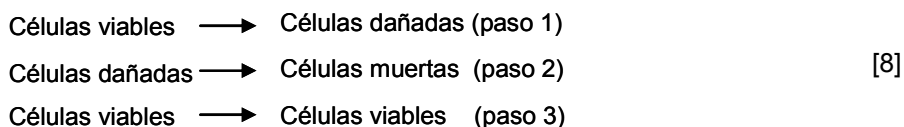
La evaluación de la integridad de membrana es la prueba más concluyente de la viabilidad celular. Las células sin una membrana intacta no se pueden mantener ni pueden generar el gradiente electroquímico asociado al potencial de membrana. Como sus estructuras están expuestas al medio y, finalmente, se descomponen y se dañan, estas células pueden ser clasificadas como células muertas (Amor y col 2002, Nebe-von Caron y col. 2000).

La integridad de la membrana puede ser detectada por exclusión o por retención de tinciones. Las células con membranas intactas son permeables a varias tinciones, como SYTOX (Gregory y col. 2001, Quirós y col. 2009) o cianinas (TOPRO, serie TOTO) mientras que los tintes como el IP incapaces de atravesar las membranas, sólo se filtran en células con daño estructural.

Por tanto, el seguimiento con CF permite realizar una cuantificación rápida y precisa de la biomasa en tiempo real. Los resultados obtenidos para evaluar los diferentes grados de integridad de membrana están asociados a la presencia de estados intermedios celulares.

4.4.3 Modelo cinético

La dinámica poblacional de las dos cepas consideradas en este estudio se modeló sobre la base de un esquema de reacción simplificado con los siguientes supuestos: (1) la biomasa total está constituida por tres sub-poblaciones, es decir, las bacterias que viven, las bacterias dañadas y las bacterias muertas; (2) las bacterias que viven pueden pasar a dañadas por presentar daño de membrana; (3) durante las primeras horas de crecimiento, la principal evolución observada es la de las células vivas a bacterias dañadas; (4) después de este período, las células vivas se reproducen principalmente a otras células vivas, mientras que las células dañadas se producen a un ritmo menor y evolucionan hacia las bacterias muertas. El siguiente esquema de reacción (8) se basa en los supuestos antes mencionados:



Basados en estos supuestos, se probaron dos modelos cinéticos. Para el desarrollo de los modelos sólo se tuvo en cuenta la cantidad de biomasa (g.L^{-1}) que se generó para cada estado celular durante el crecimiento, sin valorar ningún sustrato ni producto metabólico ocasionado por el crecimiento y considerando las tres primeras fases del crecimiento de los microorganismos.

Estos modelos se basan en la ecuación logística aplicada a las células vivas y muertas, ya que sus curvas cinéticas son similares en forma (Fig. 24). Por tanto, la dinámica de las células dañadas puede describirse a partir de estos modelos. La diferencia entre los dos modelos viene de la consideración de la existencia de una o más etapas, teniendo en cuenta las relaciones cinéticas entre las subpoblaciones celulares. El tiempo se utilizó para reflejar estas relaciones.

El primer modelo considera que no hay ningún cambio en la evolución de la tendencia de las células vivas hacia la producción de más células vivas o hacia el aumento de las células dañadas. Esto quiere decir, que

los cambios de las constantes de crecimiento de las dos poblaciones tienen una relación cinética similar. Entonces, las hipótesis 3 y 4 no se aplican.

El segundo modelo es más complejo y refleja el paso de células vivas a dañadas y la conversión de las células dañadas a células muertas, en diferentes tiempos por lo que su cinética no es similar. Esta discontinuidad en el tiempo se introduce en el modelo a través de dos parámetros cinéticos o constantes de tiempo.

En ambos modelos, la evolución de la concentración de células vivas, C_V y la evolución de las células muertas, C_M se calcularon mediante la ecuación logística respectiva, dada por las ecuaciones [9] y [10]:

$$C_V = \frac{C_{Vmax} \cdot C_{V0} \cdot e^{k_1 t}}{(C_{Vmax} + C_{V0} \cdot (e^{k_1 t} - 1))} \quad [9]$$

$$C_M = \frac{C_{Mmax} \cdot C_{M0} \cdot e^{k_2 t}}{(C_{Mmax} + C_{M0} \cdot (e^{k_2 t} - 1))} \quad [10]$$

Donde C_{Vmax} es la concentración máxima de células vivas, C_{V0} es la concentración inicial de células vivas, k_1 es la constante de velocidad máxima de crecimiento de las células vivas, t es el tiempo, C_{Mmax} es la concentración máxima de células muertas, C_{M0} es la concentración inicial de células muertas y k_2 es la constante de velocidad máxima de crecimiento de las células muertas.

La concentración de células dañadas se relaciona con las de células vivas y muertas. La concentración de células con daño celular generada a partir de las células vivas puede ser ajustada a la ecuación [11]:

$$C_{D1} = k_3 \cdot \frac{C_{Vmax} \cdot C_{V0} \cdot e^{k_1(t-t_v)}}{(C_{Vmax} + C_{V0} \cdot (e^{k_1(t-t_v)} - 1))} \quad [11]$$

Donde k_3 es la constante cinética de primer orden, de daño celular (transformación de las células vivas en células dañadas) y t_v es el tiempo que tarda una célula viva en presentar daño en la membrana.

En un momento dado, las células dañadas comienzan a evolucionar hacia células muertas. Este fenómeno cinético se puede representar por:

$$C_{D2} = k_4 \cdot \frac{C_{Mmax} \cdot C_{M0} \cdot e^{k_2(t-t_m)}}{(C_{Mmax} + C_{M0} \cdot (e^{k_2(t-t_m)} - 1))} \quad [12]$$

Donde k_4 es la constante cinética de primer orden, del proceso de muerte celular de las células dañadas y t_m es el tiempo que tarda una célula dañada en morir.

Por lo tanto, la evolución temporal de las células se obtiene mediante el siguiente balance de materia:

$$C_D = C_{D0} + C_{D1} - C_{D2} \quad [13]$$

El modelo 1 considera que t_v y t_m son iguales a cero, mientras que el modelo 2 considera que tiene un valor distinto de cero, por lo que son posibles varias etapas de crecimiento en este último modelo, lo que refleja los supuestos 3 y 4. Estos modelos, permiten ajustar al mismo tiempo varios estados fisiológicos celulares (que son los modelos de segregación), y no incluyen el sustrato ni la cinética de otros metabolitos (no son modelos estructurados).

Los resultados del ajuste de los datos obtenidos con las cepas de E-981024 y E-22115 a los dos modelos cinéticos probados se muestran en las tablas 11 y 12, respectivamente. Los valores negativos de t_v y t_m significan que el daño en la población de bacterias aumenta en un tiempo menor que la población de células vivas y muertas. Esto es evidente en la figura 25, donde la tasa de crecimiento al inicio de la experimentación para las bacterias dañadas es siempre el más alto. La presencia de un máximo a valores de tiempo bajos sugiere la adaptación de las células vivas al medio de cultivo y a partir de ese momento, o incluso a un valor de tiempo ligeramente más bajo, las células vivas se reproducen. Este evento es concomitante con la fuerte disminución en la reproducción de bacterias con paredes celulares comprometidas. Una hora antes o menos, y con ambas cepas, las bacterias dañadas han comenzado a evolucionar rápidamente a células muertas, teniendo en cuenta los valores de t_v y t_m .

Los resultados, muestran que el modelo 2 es el más adecuado desde un punto de vista estadístico, con valores altos de F95 y valores bajos del criterio AIC, además de menores amplitudes de los intervalos de error para el 95% de confianza, de los parámetros cinéticos, a excepción de las constante cinéticas k_3 y k_4 que presentan errores relativos más bajos en el modelo 1.

Tabla 11.- Comparación entre los modelos cinéticos propuestos para la cepa E-981024. Parámetros estadísticos.

Modelo (número - ecuaciones)	Parámetros	Valor \pm error	Sqr	F ₉₅	AICc
Modelo 1 (ec. 3 a ec. 7) $t_v=0$, $t_m=0$	C_{Vmax}	$5,33 \times 10^{-1} \pm 8,13 \times 10^{-3}$	$1,69 \times 10^{-2}$	1286	-6,59
	C_{Mmax}	$1,85 \times 10^{-1} \pm 7,09 \times 10^{-3}$			
	k_1	$6,04 \times 10^{-1} \pm 1,81 \times 10^{-2}$			
	k_2	$6,89 \times 10^{-1} \pm 3,81 \times 10^{-2}$			
	k_3	$-9,97 \times 10^{-1} \pm 1,82 \times 10^{-1}$			
	k_4	$-3,07 \pm 4,18 \times 10^{-1}$			
Modelo 2 (ec. 3 a ec. 7)	C_{Vmax}	$5,33 \times 10^{-1} \pm 3,83 \times 10^{-3}$	$2,32 \times 10^{-3}$	7039	-8,29
	C_{Mmax}	$2,06 \times 10^{-1} \pm 3,83 \times 10^{-3}$			
	k_1	$6,10 \cdot 10^{-1} \pm 7,42 \times 10^{-3}$			
	k_2	$4,56 \times 10^{-1} \pm 1,54 \times 10^{-2}$			
	k_3	$9,93 \pm 5,44$			
	k_4	$25,5 \pm 14,1$			
	t_v	$-7,96 \pm 1,53$			
	t_m	$-6,41 \pm 1,07$			

Nota: C_{Vmax} , C_{Mmax} (g/L); k_1 , k_2 (g/L·min), k_3 , k_4 (adimensional), t_v , t_m (min).

Tabla 12.- Comparación entre los modelos cinéticos propuestos para la cepa E-22115. Parámetros estadísticos.

Modelo (número - ecuaciones)	Parámetros	Valor \pm error	SQR	F ₉₅	AICc
Modelo 1 (ec. 3 a ec. 7) $t_v=0$, $t_m=0$	C_{Vmax}	$4,58 \pm 1,42 \times 10^{-1}$	$3,98 \times 10^{-1}$	748	-2,86
	C_{Mmax}	$1,62 \pm 3,48 \times 10^{-1}$			
	k_1	$6,42 \cdot 10^{-1} \pm 1,34 \times 10^{-2}$			
	k_2	$3,35 \cdot 10^{-1} \pm 4,68 \times 10^{-2}$			
	k_3	$1,40 \cdot 10^{-1} \pm 3,27 \times 10^{-2}$			
	k_4	$4,50 \cdot 10^{-1} \pm 8,35 \times 10^{-2}$			
Modelo 2 (ec. 3 a ec. 7)	C_{Vmax}	$4,62 \pm 7,21 \times 10^{-2}$	$9,58 \times 10^{-2}$	2312	-4,06
	C_{Mmax}	$1,29 \pm 8,59 \times 10^{-2}$			
	k_1	$6,40 \cdot 10^{-1} \pm 6,65 \times 10^{-3}$			
	k_2	$4,14 \cdot 10^{-1} \pm 3,03 \times 10^{-2}$			
	k_3	$5,19 \cdot 10^{-1} \pm 1,70 \cdot 10^{-1}$			
	k_4	$1,94 \pm 6,49 \times 10^{-1}$			
	t_v	$-3,77 \pm 1,61$			
	t_m	$-5,54 \pm 1,01$			

Nota: C_{Vmax} , C_{Mmax} (g/L); k_1 , k_2 (g/L/min), k_3 , k_4 (adimensional), t_v , t_m (min).

La mayor bondad del ajuste de los datos al modelo cinético 2 es evidente cuando se comparan figuras 25 y 26, especialmente en la evolución de las subpoblaciones de células dañadas y muertas, que son predichas con mayor exactitud por el modelo 2, para ambas cepas.

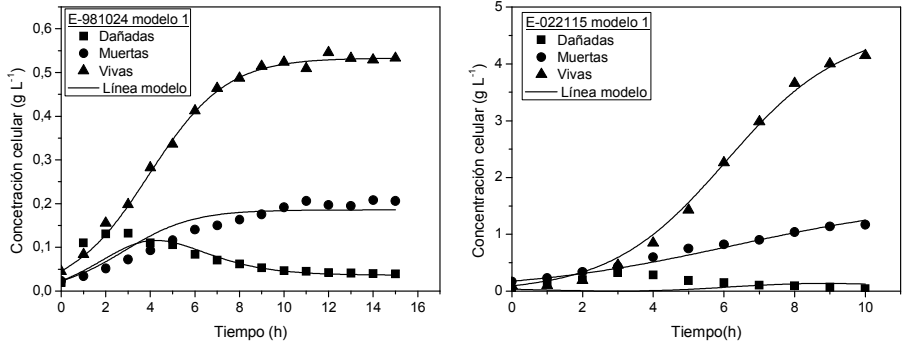


Figura 25.- Ajuste del modelo 1 a las células vivas muertas y dañadas de las cepas E-981024 y E-22115.

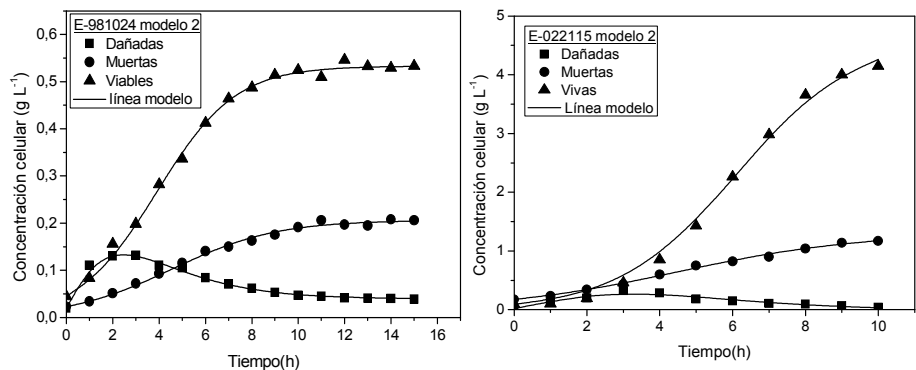


Figura 26.- Ajuste del modelo 2 a las células vivas muertas y dañadas de las cepas E-981024 y E-22115.

5 Conclusiones

Los resultados alcanzados en esta tesis doctoral contribuyen a aumentar el conocimiento de los principales microorganismos que forman biopelículas en la industria papelera y de su comportamiento, lo que permite optimizar los tratamientos de control de los mismos. Además, se han desarrollado técnicas experimentales novedosas que facilitan su monitorización.

El análisis de la identificación y caracterización de las bacterias formadoras de biopelícula de las fábricas españolas ha permitido concluir los siguientes aspectos:

- Las bacterias formadoras de biopelícula predominantes pertenecen a la familia Enterobacteriaceae.
- Para su rápida detección se desarrollaron y validaron con éxito tres sondas FISH, la ERIC-1 para el género *Enterobacter* se basó en la secuencia intergénica consenso repetitiva 16S ADN, y las sondas para los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* (ENT-1 y KPN-1) se dirigieron a la secuencia 16S ARNr de los oligonucleótidos.
- La especificidad de la técnica FISH depende de las condiciones óptimas de aplicación. En este caso, la especificidad alcanzada con las sondas estuvo entre el 75 y el 91% dependiendo de la cepa analizada. Lo que demuestra que esta técnica es una herramienta valiosa para la detección y caracterización de microorganismos formadores de biopelículas en la industria papelera.
- Los efectos de tres tipos de productos antimicrobiológicos (biocidas, dispersantes y enzimas), demostró que, en las fábricas estudiadas, los agentes de control más efectivos son los biocidas Butrol 1009 y 1072 y el tratamiento enzimático (Buzyme), sobre las enterobacterias. El efecto del tratamiento enzimático varía dependiendo del tipo de microorganismo.
- La metodología desarrollada basada en citometría de flujo es eficaz para caracterizar los efectos de los productos control, sobre los microorganismos que forman parte de la biopelícula y para seleccionar los tratamientos de control más adecuados.

Del análisis de la evaluación de los nuevos tratamientos utilizados, para controlar los problemas ocasionados por la presencia de microorganismos se concluye:

- De los 17 productos enzimáticos comerciales probados, Pectinex Smash® fue el más efectivo. Se ha identificado que la pectin-metilesterasa producida por *Aspergillus aculeatus* es el compuesto activo responsable de los efectos contra la biopelícula. Los resultados muestran que el tratamiento con el preparado comercial enzimático Novoshape® (fracción del Pectinex Smash®) puede ser eficaz tanto para evitar la formación, como para promover la degradación de las biopelículas en los circuitos de agua de las fábricas de papel.
- La nueva enzima desarrollada, llamada colanasa, es capaz de degradar los EPS de cepas formadoras de biopelícula aisladas de fábricas de papel. El efecto obtenido sobre distintas comunidades mixtas depende de la cantidad de ácido colánico presente en la biopelícula.
- El efecto de los biodispersantes sobre el comportamiento de los microorganismos depende de las cepas presentes. En los ensayos de degradación las cepas más resistentes frente a los tratamientos aplicados fueron *Streptomyces albus* y el *Bacillus licheniformes*. Por otra parte, se ha demostrado que algunos biodispersantes disponibles en el mercado, en ausencia de un microbicida, tienen poca o ninguna capacidad para prevenir o eliminar una biopelícula ya formada. La biodegradabilidad de estos productos permite en algunos casos que sean utilizados como fuente de alimento por los microorganismos.

Los estudios realizados para el desarrollo de una técnica de seguimiento de los efectos de los productos control sobre la biopelícula, permite concluir que:

- La metodología desarrollada, en base a la toma de imágenes de la formación de biopelículas con la sonda PVM, es una herramienta adecuada para: 1) controlar la formación de biopelículas y su crecimiento; 2) determinar los efectos de los productos antimicrobianos sobre la formación de biopelículas y 3) para seleccionar el tratamiento más eficaz y evaluar sus efectos sobre la contaminación biológica.
- La técnica desarrollada es más precisa que los métodos tradicionales basados en la medición del peso de la biopelícula porque evita la manipulación de las muestras y, por tanto, la pérdida de biomasa que está débilmente adherida

como, por ejemplo, en el caso de tratamientos enzimáticos cuando se valoró la formación sobre los cupones. En los demás casos los resultados tienen la misma tendencia que los obtenidos con técnicas convencionales. Las dos causas de las diferencias más significativas entre los resultados obtenidos con ambas técnicas son: 1) la menor adherencia de los microorganismos a la ventana de zafiro, que puede conducir a un retraso de las primeras etapas de la formación de la biopelícula y 2) la pérdida de materia orgánica de la biopelícula cuando se manipulan los cupones.

El análisis del estudio de viabilidad celular de dos microorganismos considerados problemáticos, permite concluir:

- La identificación y cuantificación de los diferentes estados celulares por medio de citometría de flujo fue un éxito, gracias a la combinación de yoduro de propidio y naranja de tiazol como marcadores fluorescentes. La información cuantitativa sobre la dinámica del estado celular obtenida a partir del análisis de citometría de flujo permite la propuesta y verificación de modelos matemáticos que describen el comportamiento cinético de las subpoblaciones medidas.
- El primer modelo considera que no hay ningún cambio en la tendencia de las células vivas durante el crecimiento celular en la evolución hacia viable o hacia las células dañadas, por lo que no hay ningún cambio en las relaciones cinéticas de las distintas subpoblaciones involucradas. El segundo modelo más complejo refleja que las células vivas son la fuente de las células dañadas en las primeras horas de crecimiento, mientras que en una segunda etapa las células vivas producen principalmente células vivas. En esta segunda etapa, las células dañadas evolucionan hacia células muertas. En ambos casos, el modelo cinético más complejo presenta un mejor ajuste a los datos experimentales.

6 Recomendaciones futuras

La tesis doctoral deja constancia de la importancia del seguimiento de la actividad microbiana dentro de un proceso de fabricación de papel, con el fin de evitar efectos indeseados y además, deja abiertas nuevas expectativas que permitirán continuar y abrir nuevas líneas de investigación, como son:

- Estudiar las propiedades fisicoquímicas, enzimáticas y biológicas de la enzima pectin-metilestearasa.
- Continuar con el desarrollo e investigación de la enzima colanasa.
- Extender la búsqueda de tratamientos enzimáticos que permitan controlar la formación de biopelícula.
- Estudiar la combinación de los diferentes productos control que permitan disminuir o evitar los riesgos de toxicidad en los vertidos.
- Mejorar la técnica PVM antes de su adaptación nivel industrial. Esta mejora debe ir encaminada a la modificación de la lente usada para que permita una mayor adherencia por parte de los microorganismos.
- Continuar con el estudio de las diferentes variables implicadas en la formación de la biopelícula con las técnicas desarrolladas durante la tesis doctoral y adaptarlas a nuevos modelos cinéticos de crecimiento.

7 Bibliografia

- Akaike H (1976). Canonical Correlation Analysis of Time Series and the Use of an Information Criterion. Raman KM and Dimitri GL, Elsevier 126: 27-96.
- Akihiro Y, Hideaki N, Keita T, Tomohiko N, Yuna S, Mihoko Y, Masahiko N, Minoru W, Ken O, Akira S, Hideshige T, Kazuhiro K, Kouichi O (2006). Microbial responses using denaturing gradient gel electrophoresis to oil and chemical dispersant in enclosed ecosystems. Mar Poll Bull. 52: 89-95.
- Alén R (2007). Papermaking chemistry, Paperi ja Puu Oy Helsinki. 54-123. ISBN 978-952-5216-24-0.
- Allan VJM, Macaskie LE, Callow ME (1999) Development of a pH gradient within a biofilm is dependent upon the limiting nutrient. Biotechnol Lett. 21 (5): 407-413.
- Allison PJ (1984). Waste paper - a source for microbiological contamination". Paper Southern Africa. Julio/Agosto: 23-26.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev. 59: 143-169.
- Amann RI, Fuchs BM, Behrens S (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. Curr Opin Biotechnol. 12: 231-236.
- Angell P, Arrage AA, Mittelman MW, White DC (1993). On line, non-destructive biomass determination of bacterial biofilms by fluorimetry. J Microbiol Meth. 18: 317-327.
- Bajpai P (1999). Application of enzymes in the pulp and paper industry. Biotechnol Prog. 15: 147-157.
- Barnes RW (1984). Biocide update: current practices for cost-effective mill slime control. Pulp Pap. June: 113-115.
- Bastos F, Mesquita RBR, Ferreira J, Fernandez SMV, Castro PML, Rangel AOSS (2002). On -line monitoring of a trickling filter turing treatment of chlorobenzene contaminated waste. Proccedings of the

- International Specialized Conference on Biofilm Monitoring. Porto. March 17-20. 218-221.
- Bauer W; Robinson J (2002). Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms *Curr Opin Biotechnol.* 13:234-237.
- Bardouniotis E, Ceri H, Olson ME (2003). Biofilm formation and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium marinum*. *Current Microbiology.* 46: 28-32.
- Beauchamp CJ, Simao-Beaunoir AM, Beaulieu C, Chalifour FP (2006). Confirmation of *E. coli* among other thermotolerant coliform bacteria in paper mill effluents, wood chips screening rejects and paper sludges. *Water Res.* 40: 2452-2462.
- Belosinschi D, Bobu E (2007). Process water of papermaking: model building and characterization. *Environ Eng Manag J.* 6(4): 261-268.
- Beneventi D, Carre B (2001). Physico-chemical aspects of deinking. 5th Advance training course on deinking technology. March 2001. Grenoble-France.
- Bennett C (1985). Control of microbial problems and corrosion in closed systems. *Paper Technol Ind.* Noviembre: 331-335.
- Berard P (2000). Filling in the holes after closing the loop. *Pulp Pap Int.* 42(4): 44-51.
- Berney M, Weilenmann H, and Egli T (2006). Flow cytometry study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS). *Curr Opin Microbiol* 152:1719-1729.
- Blanco A and Gaspar I (1996). Microbial aspects of the recycling paper industry. In: *Paper recycling: an introduction to problems and their solutions.* A. Blanco, C. Negro and J. Tijero, eds. European Commission ISBN 92-828-1801-2: 153-187.
- Blanco A (2003). Microbiology in papermaking, *Recent Res Devel Appl Microbiol Biotechnol.* 1: 87-134 ISBN:81-271-0043-9.
- Blanco A, Negro C, Monte C, Fuente E, Tijero J (2004). The challenges of sustainable papermaking. *Environ Sci Technol.* November 1 38(21): 414 A- 420 A.

- Blevins WT, Schrader KK and Saadoun I (1995). Comparative physiology of geosmin production by *Streptomyces halstedii* and *Anabaena* sp. *Water Sci Technol.* 31(11): 127-133.
- Bott TR (2007). Biofilms and biocides: Growing consistent monoculture biofilms for biocide assessment. *ACS Symposium Series 967 (New Biocides Development)* 92-121.
- Bryers JD (2000). *Biofilms II, Process analysis and applications.* Wiley-Liss Inc., ISBN 0-471-29656-2.
- Burmolle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sorensen SJ and Kjelleberg S (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multi-species biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* June: 3916-3923.
- Cardoso X (1992). Aplicación de biodispersantes: cómo reducir la demanda de biocida de un sistema. *El Papel.* April: 47-50
- Carpentier B, Chassaing D (2004). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *Int J Food Microbiol.* 97: 111-122.
- Confederation of European paper industries (CEPI) (2010) Key statistics 2010 European pulp and paper industry. <http://www.cepi.org>.
- Chandy R, Scully P, Eldridge P, Kadim H, Grapin M, Guy M, D'Ambrosio M, Colin F (2000). An optical fiber sensor for biofilm measurement using intensity modulation and image analysis. *IEEE J Sel Top Quant.* 6(5): 764-762.
- Characklis WG (1990). Biofilm processes. In: *Biofilms*, W.G. Characklis and K.C. Marshall, eds. Wiley-Interscience. Chapter 7: 195-231.
- Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hebraud M, Bernardi T (2007). A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Method.* (68): 605-612.
- Christensen B, Sternberg C, Andersen J, Palmer R, Nielsen A, Givskov M, Molin S (1999). Molecular tools for study of biofilm physiology. *Method Enzymol.* 310: 20-42.

- Cloete TE, Brözel VS, Von Holy A (1992). Practical aspects of biofouling control in industrial water systems. *Internat Biodeteriorat Biodegradat.* 29: 299-341.
- Colasurdo AR and Wilson J (1988). A new perspective on deposit control. In: TAPPI Papermakers Conference, Tappi Press, Atlanta. 341-343.
- Costerton W, Lappin-Scott H (1995). Introduction to microbial biofilms Microbial. *Plant Microbial Biotechnol Res.* Cambridge, UK, 1-11. In: Lappin-Scott HM and JW Costerton (Eds), *Microbial biofilms, Plant and microbial biotechnologyresearch series: 5*, University Press, Cambridge, UK.
- Costerton JW (2007). *The biofilm primer.* Springer-Verlag Berlin Heiderberg.
- Cox S (1989). Corrugating medium mills face a common and deadly enemy. *American Papermaker.* 33, Agosto.
- Cristiani P, Perboni G, Hilbert L, Mollica A, Gubner R (2002). Experiences on MIC monitoring by electrochemical techniques. *Proceedings of the International Specialized Conference on Biofilm Monitoring.* Porto. March 17-20. 197-200.
- Dauga C (2002). Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52: 531-47
- Delord F (1999). Le contrôle des biopelículas par voie enzymatique. *Rev. Papier Carton.* 25: 70-73.
- Denis JE, Gay DM, Welsch RE (1981). Algorithm 573:NL2SOL- An Adaptative Nonlinear Least-squares Algorithm. *ACM Trans Math Softw* 7(3): 369-383.
- DesiKan S, Davis W, Ward J, Parsons R, Toma PH (2001). Crystallization development using PVM/FBRM: A case study. *Lasentec Users Forum.* February 25-28, 2001. Barcelona Spain.
- Desjardins E, Beaulieu C (2003). Identification of bacteria contaminating pulp and paper machine in a Canadian paper mill, *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30: 141-145.

- Dhiman SS, Sharma J, Battan B (2008). Microbial xylanases: review. *Bioresurces* 3(4): 1377-1402.
- Diaz M, Herrero M, García LA, Quirós C (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem Eng J* 48: 385–407.
- Dieter J (1981). Closure of paper and board mill production systems and its effects on production conditions. *Tappi Annual Meeting*. 95-109.
- Disnard J, Beaulieu C, Villemur R (2011). Composition of the bacterial biota in slime developed in two machines at a Canadian paper mill. *Canadian J Microbiol*. 57(2): 91-104.
- Eklund D and Lindström T (1991). Paper chemistry: an introduction. DT Paper Science Publications. Grankulb, Finland: 295-305.
- Ekman J, Kosonen M, Jokela S, Kolari M, Korhonen P, Salkijona-Salonene M (2007). Detection and quantisation of colored deposit-forming *Meiothermus* spp in paper industry and end products. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 34: 203-211.
- Ekman JV, Raulio M, Busse HJ, Salkinoja-Salonen M, Fewer D (2011). *Deinobacterium chartae* gen. nov., sp. nov., an extremely radiation-resistant, biofilm-forming bacterium isolated from a Finnish paper mill. *Int J Syst Evol Microbiol*. 61: 540–548.
- Femenia A, Garosi P, Roberts K, Waldron KW, Selvendran RR, Robertson JA (1998). Tissue-related changes in methyl-esterification of pectic polysaccharides in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) stems. *Planta*. 205: 438-444.
- Finnish Environment Institute (2007). Limantorjuntakemikaalien myynti vuosina 1994-2006 (total sales of slimcides in Finland in 1994-2006), Suomen Ympäristökeskus homepage, Ympäristö 8/2007. <http://www.ymparisto.fi/default.asp?contentid=260032&lan=fi&clan=fi#a1>.
- Flemming H (2002). Mini-review: biofouling in water systems cases, causes and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol*. 59: 629-640.
- Foladori P, Bruni L, Tamburini S, Ziglio G (2010). Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of

- wastewater treatment plants by using flow cytometry. *Water Res.* 44: 3807-3818.
- Ford T, Mitchell R (1990). The ecology of microbial corrosion. *Adv Microbial Ecology*. 11: 231-262.
- Freis RE (1984). The effect of a specific enzyme on biocide use. *Tappi J.* 67(10): 100-102.
- Gauthier F, Neufeld JD, Driscoll BT, Archibald F (2000). Coliform bacteria and nitrogen fixation in pulp and paper mill effluent treatment systems. *Appl Environ Microbiol* 66: 5155-5160.
- Gerber NN (1983). Volatile substances from actinomycetes: Their role in the odor pollution of water. *Water Sci Technol.* 15: 115-125.
- Grant R (1998). Enzymes come under the microscope. *Pulp Pap Int.* August: 35-37.
- Gregory G, Citterio S, Ghiani A, Labra M, Sgorbati S, Brown S, Denis M (2001). Resolution of viable and membrane compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. *Appl Environ Microbiol.* 67: 4662-4670.
- Hadjiev D, Dimitrov D, Martinov M, Sire O (2007). Enhancement of the biofilm formation on polymeric supports by surface conditioning. *Enzyme Microb Tech.* 40: 840-848.
- Hamann OS, Montague TW, Reed BW, Hokanson JV (1998). Imaging apparatus of multiphase fluid medium - has image detector with CCD array which outputs image to electronics package, for suitable conversion. Patent number: WO9845682-A.
- Hammes F, Berney M, Wang Y, Vital M, Köster O, Egli T (2008). Flow-cytometric total bacterial cells counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Res.* 42: 269-277.
- Herrero M, Quirós C, García LA, Díaz M (2006). Use of flow cytometry to follow the physiological states of microorganisms in cider fermentation processes. *Appl Environ Microbiol* 72: 6725-6733.
- Hughes-van-Kregten MC (1988). Biofilm flora of New Zealand paper mills. *Appita.* 41(6): 475-479.

- Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and other enterobacteria. *Mol Microbiol.* 5: 825-834.
- Janknecht P, Melo LF (2003). Online biofilm monitoring, Reviews. In *Environmental Sci Biotechnol.* 2: 269-283.
- Jass J, Costerton J, Lappin-Scott H (1995). Assessment of a chemostat-coupled modified Robbins device to study biofilms. *J Ind Microbiol Biot.* 15: 238-289.
- Jensen A, Larsen M, Ingmer H, Vogel B, Gram L (2007). Sodium chloride enhances adherence and aggregation and strain variation influences invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. *J Food Protection.* 70: 592-599.
- Johnsrud C (1997). Biotechnology for Solving Slime Problems in the Pulp and Paper Industry. *Adv Biochem Engin Biotechnol.* 57: 312-326.
- Johnsrud C. (2000) Paper mill micro-organisms *Inv Tec Papel.* 497-506.
- Joux F, Lebaron P (2000). Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect* 2 (12): 1523-1535.
- Jung WK, Kutzner HJ (1978). Microbiologic problems associated with closed process water systems in the paper industry. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 5: 215-224.
- Kallio T, Kekkonen J, Stenius P (2004). The formation of deposits on polymer surfaces in papermachine wet end. *J Adhesion.* 80: 933-969.
- Kanto-Öqvist C (2008). Microbial Life and Deposits in Paper Machine Circuits. Thesis. Faculty of Agriculture and Forestry University of Helsinki.
- Kanto-Öqvist L, Jörstad U, Pöntinen H, Johnsen L (2001). Deposit control in the paper industry, 3rd ECOPAPERTECH Conference, June: 269-280. ISBN 951-97513-8-6.
- Kempf VAJ, Trebesius K, Autenrieth IB (2000). Fluorescent in situ Hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol.* 38: 830-838

- Kielemoes J, Bultinck I, Storms H, Boon N, Verstraete W (2002). Occurrence of manganese-oxidizing microorganisms and manganese deposition during biofilm formation on stainless steel in brackish surface water. *FEMS Microbiol Ecol.* 39: 41–55.
- Kiuru J (2012). Interactions of chemical variations and biocide performance at paper machines. Doctoral dissertations. Aalto University. ISBN 978-952-60-4455-2.
- Kjeldsen KU, Tang L, Giltoft M, Ingvorsen K (2009). Enumeration and identification of dominant types of sulfate-reducing bacteria in pulp from a paper-recycling plant: a multiphasic approach. *FEMS Microbiol Ecol.* 69 (3): 481–494.
- Klahre J, Flemming H (2000). Monitoring of biofouling in papermill process waters. *Water Res.* 34(14): 3657-3665.
- Knol JJ, Linssen JPH, Van Boekel MAJS (2010). Unravelling the kinetics of the formation of acrylamide in the Maillard reaction of fructose and asparagine by multiresponse modelling. *Food Chem.* 120: 1047-1057.
- Kolari M (2003). Attachment mechanisms and properties of bacterial biofilms on non-living surfaces. Thesis. Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki.
- Kolari M, Nuutinen J, Rainey FA, Salkinoja-Salonen MS (2003). Colored moderately thermophilic bacteria in paper-machine biofilms. *J Ind Microbiol Biotech.* 30(4): 225-238.
- Kolari M, Schmidt U, Kuismanen E, Salkinoja-Salonen MS (2002). Firm but Slippery Attachment of *Deinococcus geothermalis*. *J Bacteriol.* May: 2473-2480.
- Korber DR, Lawrence JR, Lappin-Scott HM, Costerton JW (1995). Growth of microorganisms. In: *Microbial Biofilms* Lappin-Scott HM & Costerton JW, Eds. 15-45. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kougoulos E, Jones AG, Jennings K.H, Wood-Kaczmar MW (2005). Use of focused beam reflectance measurement (FBRM) and process video imaging (PVM) in a modified mixed suspension mixed product removal (MSMPR) cooling crystallizer. *J. Cryst. Growth.* 273: 529-534.

- Kristensen JB, Meyer RL, Laursen BS, Shipovskov S, Besenbacher F, Poulsen CH (2008). Antifouling enzymes and the biochemistry of marine settlement. *Biotechnol Adv.* 26: 471-481.
- Kumar Y, Westram R, Behrens S, Fuchs B, Glöckner FO, Amann R, Meier H, Ludwig W (2005). Graphical representation of ribosomal RNA probe accessibility data using ARB software package. *BMC Bioinformatics.* 6: 61.
- Labas M, Zalazar C, Brandi R, Cassano A (2008). Reaction Kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide. *Biochem Engin J.* 38: 78-87.
- Lal P, Agarwal V, Pruthi P, Singh S, Pruthi V (2008). Biofilm, Formation by Microorganisms Isolated from Paper Mill Effluent and its Public Health Implications. *CLEAN – Soil, Air, Water.* 36 (12): 963–968.
- Latorre WC (1990). Problemas microbiológicos em las fábricas de papel. *O Papel.* Noviembre :125-131.
- Lewandowski Z, Avci R, Geiser M, Shi X, Braughton K, Yurt N (2002) Biofouling and corrosion of stainless steels in natural waters. *Water Supply.* 2 (4): 65-72.
- Linberg LE, Holmbom BR, Väisänen OM (2001). Sugar composition of biofilms produced by paper mill bacteria. *Appl Microbiol.* 55: 638-643.
- Lisle JT, Pyle BH, and McFeters GA (1999). The use of multiple indices of physiological activity to access viability in chlorine disinfected *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol.* 29 (1), 42-47.
- Longhi C, Scoarughi GL, Poggiali F, Cellini A, Carpentieri A, Seganti L, Pucci P, Amoresano A, Cocconcelli PS, Artini M, Costerton JW, Selan L (2008). Protease treatment affects both invasion ability and biofilm formation in *Listeria monocytogenes*. *Microb Pathog.* 45: 45-52.
- Ludensky M (2003). Control and monitoring of biofilms in industrial applications. *International Biodeter Biodegrad.* 51: 255-263.
- MacDonald R, Santa M, Brozel V (2000). The response of a bacterial biofilm community in a simulated industrial cooling water system to treatment with an anionic dispersant. *J Appl Microbiol.* 89: 225-235.

- Manz B, Volke F, Goll D, Horn H (2003). Measuring local flow velocities and biofilm structure in biofilm systems with Magnetic Resonance Imaging (MRI) *Biotechnol Bioengin.* 84 (4): 424-432.
- Mattila-Sandholm T, Wirtanen G (1992). Biofilm formation in the industry: a review. *Food Rev Int.* 8(4): 573-603.
- Mauricio R, Dias CJ, Santana F (2006). Monitoring biofilm thickness using a non-destructive, on-line, electrical capacitance technique. *Env Monit Assess.* 119: 599-607.
- Mckay AM (1993). A Review Microbial carboxylic ester hydrolases (EC 3.1.1) in food bio technology. *Letters Appl Microbiol.* 16:1-6.
- McLean R, Pierson L, Fuqua C (2004). A simple screening protocol for the identification of quórum signal antagonists *J Microbiol Methods.* 58: 351-360.
- Medsker LL, Jenkins D, Thomas JF, Koch C (1969). Odorous compounds in natural waters: 2-exo-hydroxy-2-methylbornane, the major odorous compound produced by several actinomycetes. *Environ Sci Technol.* 3(5): 476-477.
- Micheli F. (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *TRENDS Plant Sci.* 6(9): 414-419.
- Mollica A, Cristiani P (2003). On line biofilm monitoring by "BIOX" electrochemical probe. *Water Sci Technol.* 47(5): 45-49.
- Monds RD, Newell PD, Wagner JC, Schwartzman JA, Lu W, Rabinowitz JD, O'toole GA (2010). Di-adenosine tetraphosphate (Ap4A) metabolism impacts biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* via modulation of c-di-GMP-dependent pathways. *J Bacteriol.* June: 3011-3023.
- Moor AH, Hatch MJ (1984). Enzymes to control microbiological deposits. Pira Conference "Biofilm & its Control" SPB/3', January 1984.
- Morris C, Monier J, Jacques M (1997). Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 63: 1570-1576.

- Morros J (1995). Nouvelles approches pour le traitement bacteriologique des eaux de circuit de papeteries. *Revue ATIP*. 49(3): 96-98.
- N.N. Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market.
- Nebe-von-Caron G, Stephens P, Hewitt C, Powell J, Badley R (2000). Analysis of bacterial function by multi-color fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J Microbiol Methods*. 42: 97-114.
- Negro C, Fuente E, Sanchez LM, Blanco A, Tijero J (2006). Evaluation of an Alternative Flocculation System for Manufacture of Fiber-Cement Composites. *Ind Eng Chem Res*. 45: 6672-6678.
- Nivens DE, Palmer RJ, White DC (1995). Continuous non-destructive monitoring of microbial biofilms: a review of analytical techniques. *J Ind Microbiol*. 15: 263-276.
- Novo DJ, Perlmutter NG, Hunt RH, Shapiro HM (2000). Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 44 (4): 827-834.
- Oberkofler J (1990). Biocide-free biofilm and deposit control in papermaking. *Inv T c Papel*. 105: 567-578.
- Oliver JD (2005). The viable but non culturable state in bacteria. *J Microbiol Febrero*: 93-100.
- Oppong D, King V, Zhou X, Bowen J (2000). Cultural and biochemical diversity of pink pigmented bacteria isolated from paper mill slimes. *J Industrial Microbiol Biotechnol*. 25: 74-80.
- Oppong D, Vanja MK, Bowen JA. (2003). Isolation and characterization of filamentous bacteria from paper mill slimes *Int Biodeteriorat Biodegrad*. 52 (2): 53-62.
- Orgaz B, Kives J, Pedregosa AM, Monistrol IF, Laborda F, SanJose C (2006). Bacterial biofilm removal using fungal enzymes. *Enzyme Microbial Technol*. 40: 51-56.

- Orgaz B, Neufeld RJ, SanJose C (2007). Single-step biofilm removal with delayed release encapsulated Pronase mixed with soluble enzymes. *Enzyme Microbial Technol.* 40: 1045-1051.
- O'toole G, Kaplan H, Kolter R (2000). Review. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 54:49-79.
- Oulahal N, Martial-Gros A, Bonneau M, Blum LJ (2007). Removal of meat biofilms from surfaces by ultrasounds combined with enzymes and/or a chelating agent. *Innovative Food Sci Emerging Technol.* 8: 192-196.
- Palcic MM, Teodorescu G (2002). The development of biocide-tolerant microorganisms. In papermaking systems, 88th Annual meeting, m PAPTAC 88e Congrès annuel, C/ 69CJMI08850821N: c163-c168.
- Paterson-Beedle M, Macaskie LE, Lee CH, Hriljac JA, Jee KY, Kim WH (2006). Utilisation of a hydrogen uranyl phosphate-based ion exchanger supported on a biofilm for the removal of cobalt, strontium and caesium from aqueous solutions. *Hydrometallurgy.* 83(1-4): 141-145.
- Pauly D, Ronninger V (2000) Problems in paper industry associated to microorganisms. Technical Internal report. PTS
- Pereira MA, Roest K, Stams AJM, Akkermans ADL, Amaral AL, Pons MN, Ferreira EC, Mota M & Alves MM (2003). Image analysis, methanogenic activity measurements and molecular biological techniques to monitor granular sludge from an EGSB reactor fed with oleic acid. *Water Sci. Technol.* 47(5): 181–188.
- Peters RPH, Savelkoul PHM, Simoons-Smit AM, Danner SA, Vandenbroucke-Grauls, CMJE, van Agtmael MA (2006). Faster identification of pathogens in positive blood cultures by fluorescence in situ hybridization in routine practice. *J Clin Microbiol.* 44: 119-123.
- Pirttijärvi TSM, Graeffe TH, Salkinoja-Salonen MS (1996). Bacterial contaminants in liquid packaging boards:assessments of potential for food spoilage. *J Appl Bacteriol.* 81: 445-458.
- Pirttijärvi TSM, Wahlström G, Rainey F, Saris PEJ, Salkinoja-Salonen MS (2001). Inhibition of bacilli in industrial starches by nisin. *J Indust Microbiol Biotechnol.* 26: 107-114.

- Porton G, Dubout G (1995). Biocomplexation. *Rev ATIP* 49: 100-103.
- Prince V, Simao-Beaunoir AM, Beaulieu C. (2009). Amplified ribosomal DNA restriction analysis of free-living bacteria present in the headbox of a Canadian paper machine. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36(3): 391-399. DOI: 10.1007/s10295-008-0509-4.
- Quiros C, Herrero M, García L, Díaz, M (2007). Application of flow cytometry to segregated kinetic modeling based on the physiological states of microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* June: 3993-4000.
- Quiros C, Herrero M, García L, Díaz M (2009). Quantitative approach to determine the contribution of viable-but-noncultivable subpopulations to malolactic fermentation processes. *Appl Environ Microbiol.* May: 2977-2981.
- Ramaraja P, Ren Z, Mench M, Reagan J (2008). Impact of initial biofilm growth on the anode impedance of microbial fuel cells. *Biotech Bioeng.* 101: 101-108.
- Rätto M, Siika-aho M, Mustranta A (2001). Strains degrading polysaccharides produced by bacteria from paper machines. *Appl Microbiol Biotechnology.* 57: 182-185.
- Rätto M, Suihko ML, Siika-aho M (2005). Polysaccharide-producing bacteria isolated from paper machine deposits. *J Indust Microbiol Biotechnol.* 32: 109-114.
- Rätto M, Verhoef R, Suihko M-L, Blanco A, Schols HA, Voragen AGJ, Wilting R, Siika-aho M, Buchert J (2006). Colanic acid is an exopolysaccharide common to many enterobacteria isolated from paper-machine slimes. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 33: 359-367
- REACH Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC.
- Robertson LR (1994). Microbial growth in starch. *PIMA Magazine.* June.

- Robertson LR, Taylor NR (1994). Biofilms and dispersants: A less-toxic approach to deposit control. *Tappi J.* 77(4): 99-107.
- Robertson L, Schwingel W (1995). The effect of water reuse on paper machine microbiology. *Environmental Conference and Exhibit.* 87-93.
- Robertson LR, Rice LE (1998). Enhanced microbial control using innovative monitoring tools and chemistries. *Appita J.* 51(6): 404-407.
- Rochibaud WT (1991). Controlling anaerobic bacteria to improve product quality and mill safety. *Tappi J.* 74(2): 149-153.
- Rowbottom RS (1989). Bacteria cause fatal explosion at corrugating medium mill. *Pulp Paper Canada.* 90(4): 75-81.
- Rowbottom RS (1993). Risks of bacterial hydrogen generation in white water systems. *Tappi J.* 76(1): 97-98.
- Safade TL (1988). Tackling the biopelícula problem in a paper-mill. *Paper Technol Ind.* September: 280-285.
- Schenker A, Singleton F, Davis C (1996). A new recipe for biofilm control. *Pulp Paper Eur.* marzo/abril: 26-29.
- Schmid T, Panne U, Haisch C, Niessner R (2003). Photoacoustic absorption spectra of biofilms. *Rev Sci Instrum.* 74: 755-757.
- Schrijver J, Wirth B (2007). Biocides for Deposit Control in the Production of Corrugated Base Paper. *Professional Papermaking.* 2: 37-43.
- Shapiro HM (2003). *Practical flow cytometry*, fourth ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Shi L, Guenther S, Hubschmann T, Wick LY, Harms H, Mueller S (2007). Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry Part A.* 71(8): 592-598.
- Sigrun J, Jukka A, Hallvard O (1999). Evaluation of internal thermophilic biotreatment as a strategy in TMP closure. *Tappi J.* 82(8): 141-149.
- Simoes M, Simoes L, Vieira M (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Sci Technol.* 43: 573-583.

- Sorrelle PH, Belgard W (1991). The effect of recycled fibre use on paper machine biological control. TAPPI Papermakers Conference Proceedings. 569-575.
- Sorrelle PH, Belgard W (1992). Growth in recycling escalates costs for paper machine biological control. Pulp Paper. May: 57-64.
- Stoodley P, K Sauer DG, Costerton JW (2002). Review. Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol. 56: 187-209.
- Sugiura N, Nishimura O, Kani Y, Inamori Y and Sudo R (1997). Evaluation of activated carbons for removal of musty odor compounds in the presence of competitive organics. Environ Technol. 18: 455-459.
- Sugiura N, Iwami N, Inamori Y, Nishimura O, Sudo R (1998). Significance of attached cyanobacteria relevant to the occurrence of musty odor in Lake Kasumigaura. Water Res. 32(12): 3549-3554.
- Suihko ML, Sinkko H, Partanen L, Mattila-Sandholm T, Salkinoja-Salonen M, Raaska L (2004). Description of heterotrophic bacteria occurring in paper mills and paper products. J Appl Microbiol. 97: 122-1235.
- Suihko ML, Koppenstedt RM, Stackebrandt E (2005). Occurrence and characterization of Actinobacteria and Thermoactinomyces isolated from pulp and board samples containing recycled fibres. J Ind Microbiol Biotechnol. DOI 10.1007/s10295-005-0055-2.
- Suihko ML, Skyttä E (2009). Characterisation of aerobically grown non-spore-forming bacteria from paper mill pulps containing recycled. J Ind Microbiol Biotechnol. 36: 53–64 DOI 10.1007/s10295-008-0472-0.
- Sutherland I (1999). Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. Carbohydr Polym. 38:319-28.
- Sutherland I, Hughes K, Skillman L, Tait K (2004). The interaction of phage and biopelliculas. FEMS Microbiol letters. 232: 1-6.
- Sutherland IW (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiol. 147: 3–9.
- Sutherland IW (2005). Microbial exopolysaccharides. In: Dumitriu S, editor. Polysaccharides, structural diversity and functional versatility. New York: Marcel Dekker. 431–57.

- Suutarinen J, Honkapää K, Heiniö R, Mustranta A, Liukkonen-lilja H, Morkkila M (2002). Modeling of Calcium Chloride and Pectin Methyl-esterase Prefreezing Treatments of Strawberries and Jams. *J Food Sci.* 67 (3): 1240-1248.
- Tamachkierw A, Flemming H (2003). On line monitoring formation in a brewery water pipeline system with a fibre optical device. *Water Sci Technol.* 47: 19-24.
- Torres E, Blanco A, Fuente E, Negro C (2008). Slime forming microorganisms monitoring in the paper industry. 4th International meeting on biotechnology, towards a sustainable bioeconomy, Biotec 2008, Granada, Spain, September 17-19. 169.
- Troccaz M, Starkenmann C, Niclass Y, van de Waal M, Clark AJ (2004). 3-Methyl-3-sulfanylohexan-1-ol as a major descriptor for the human axilla-sweat odour profile. *Chem Biodivers.* 1(7):1022-35.
- Van Haute E (1999). Biodispersant and enzyme treatments. A new approach to deposit control. *Proc. 53rd Appita Annual Conference, Rotorua, New Zealand.* 2: 575-579.
- Väisänen O, Salkinoja-Salonen W, Bennisar A; Rainay F, Busse H (1998). Microbial communities of printing paper machines. *J Appl Microbiol.* 1069-1084.
- Väätänen P, Niemelä SI (1983). Factors regulating the density of bacteria in process water of a paper mill. *J Appl Bacteriol.* 54: 367-371.
- Verhoef R, Waard P, Schols H, Rattö M, Siika-aho M, Voragen A (2002). Structural elucidation of the EPS of biofilm producing *Brevundimona vesicularis* sp. Isolated from a paper machine. *Carbohydr Res.* 337: 1821-1831.
- Verhoef R, Schols HA, Blanco A, Siika-aho M, Ratto M, Buchert J, Lenon G, Voragen AGJ (2005). Sugar composition and FT-IR analysis of exopolysaccharides produced by microbial isolates from paper mill biofilm deposits. *Biot Bioeng.* 91(1): 91-105.
- Videla H (2002). Prevention and control of biocorrosion. *Int Biodeterior Biodegrad.* 49: 259-270.
- Von Holy A (1985). Microbiological corrosion. *Paper Southern Africa, Septiembre/Octubre 1985:*12-16.

- Vrouwenvelder JS, Buitter J, Riviere M, vander Meer WGJ, van Loosdrecht MCM, Kruithof JC (2010). Impact of flow regime on pressure drop increased and biomass accumulation and morphology in membrane systems. *Water Res.* 44:689-702.
- Wan Z, Xiao C (2011). Deposition sensor based on differential heat transfer resistance. Patent N° US2011/0096807 A1.
- Watnick P, Kolter R (2000). Biofilm, city of Microbes. *J Bacteriol.* 2675-2679.
- Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv.* 22: 161-187.
- Wirtanen G, Salo S, Helander I, Mattila-Shaldom T (2001). Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloid Surface B.* 20: 37-50.
- Xiaofeng W, Krull U (2005). Synthesis and fluorescences studies of thazole orange tethered onto oligonucleotide: development of a self-contained DNA biosensor on a fiber optic surface. *Bioorg Med Chem Lett.* 1725-1729.